

**NEGATIVE RÜCKKOPPELUNGSMECHANISMEN
DES HUMORALEN IMMUNSYSTEMS**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Johannes Gutenberg Universität Mainz

vorgelegt von

BRIGITTE STOCKINGER

aus Mainz

Mainz 1978

NEGATIVE RÜCKKOPPELUNGSMECHANISMEN DES HUMORALEN IMMUNSYSTEMS

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Johannes Gutenberg Universität Mainz



vorgelegt von

BRIGITTE STOCKINGER

aus Mainz

Mainz 1978

Diese Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Direktor: Prof.Dr.P.Klein) der Johannes Gutenberg Universität
Mainz in der Zeit vom März 1976 bis Mai 1978 unter der Leitung
von Herrn Prof.Lemmel angefertigt.



Fachbereichsdekan: Prof.Dr.H.Risler

1. Berichterstatter: Prof.Dr.Bernhard

2. Berichterstatter: Prof.Dr.Lemmel

Datum der mündlichen Prüfung: 10.7.1978

Abkürzungen:

SRBC : sheep red blood cells, 'Schafserythrozyten'

KaRBC: 'Kaninchenerythrozyten'

LPS : Lipopolysaccharid

PFC : plaque forming cell

MEM : minimum essential medium

FKS : fetales Kälberserum

HGG : Humangammaglobulin

BGG : bovine = Rindergammaglobulin

Inhaltsverzeichnis:

Seite

A	Einleitung	1
1.	Funktionelle Zweiteilung des Immunsystems	1
2.	Charakterisierung von B und T Zellen	2
3.	Funktion des humoralen Immunsystems	3
3.1.	B Zelldifferenzierung	3
3.2.	Eigenschaften von Antigenen	4
3.3.	Zelluläre Kooperation bei der humoralen Immunantwort	5
3.4.	Mitogeninduzierte Aktivierung von B Zellen	7
3.5.	Charakterisierung einer humoralen Immunantwort	8
4.	Regulation der humoralen Immunantwort	9
5.	Eigene Fragestellung	11
B	Material und Methoden	12
I.	Material	12
1.	Versuchstiere	12
2.	Antigen	12
3.	LPS	12
II.	Methoden	12
1.	Plaqueassay	12
1.1.	Immunisierung	12
1.2.	Herstellung der Milzzellsuspension für den Plaquetest	12
1.3.	Zellzählung	13
1.4.	PFC (plaque forming cells) Medium	13
1.5.	Bestimmung der Anzahl antikörperproduzierender Zellen im Plaquetest	13
1.6.	Austestung des anti Maus γ Globulinserums (Behringwerke Marburg)	14
2.	Herstellung von Zellsuspensionen für Zelltransfer und in vitro Kulturen	15
2.1.	Milzzellsuspension	15
2.2.	Gewinnung von Makrophagen	15
2.3.	Gewinnung von T Zellen	15

2.4.	Entfernung adhärrierender Zellen	16
2.5.	Entfernung von T Zellen	16
2.6.	Herstellung Fc rezeptorfreier Zellsuspensionen	17
2.6.1	Herstellung von sensibilisierten Erythrozyten (EA)	17
2.6.2	Fc Rosettenbildung	17
2.6.3	Abtrennung von Fc rosettenbildenden Milzzellen	17
3.	Antiseren	18
3.1.	Gewinnung von Antiserum gegen SRBC	18
3.2.	Bestimmung des Hämagglutinationstiters	18
3.3.	Isolierung der IgG Fraktion	19
3.4.	Immunelektrophorese	19
3.5.	Duchterlony Immundiffusion	20
3.6.	Passive Immunisierung mit anti SRBC Serum in vivo	20
3.7.	Herstellung von F(ab) ₂ Fragmenten der Kaninchen anti SRBC IgG Fraktion	20
3.8.	Gewinnung von Antiserum gegen F(ab) ₂ anti SRBC Fragmente	20
3.9.	Proteinbestimmung	21
3.10.	Aggregation von Human-(HGG) und Rindergammaglobulin (GGG)	21
3.11.	Fluoreszenzserologischer Nachweis der Bindung von aggregiertem Gammaglobulin an Lymphozyten	21
4.	In vitro Kultursysteme	21
4.1.	Marbrook System	21
4.2.	Mishell Dutton System	22
C	Ergebnisse	24
1.	Hemmung der humoralen Immunantwort durch B Zellen ("B suppressor Zellen")	24
1.1.	Zusammenfassung vorausgegangener Untersuchungen zur Hemmung der humoralen Immunantwort durch Transfer hyperimmuner Milzzellen	24
1.2.	Übertragung normaler Milzzellen	25
1.3.	Charakterisierung der suppressiven Zellpopulation	26
1.4.	Antigenspezifität der B zellvermittelten Suppression	27
1.5.	Dauer der B Zellvermittelten Suppression	28

1.5.1	Dauer der Suppression im Empfänger	28
1.5.2	Dauer der suppressiven Wirkung des Spendermaterials	28
1.6.	Nachweis antigenspezifischer Gedächtniszellen im Spender 23 Wochen nach Zeitimmunisierung	29
1.7.	Nachweis antigenspezifischer Gedächtniszellen im Empfänger 21 Wochen nach Transfer	29
1.8.	Reaktivierung der antigenspezifischen Gedächtniszellen im Spender	30
1.9.	Reaktivierung der antigenspezifischen Gedächtniszellen im Empfänger	31
1.9.1	LPS induzierte Antikörperbildung gegen SRBC	32
1.10.	Nachweis der Antigenspezifität für die reaktivierte Hemmung im Empfänger	34
2.	Hemmung der humoralen Immunantwort durch Antikörper in vivo	34
2.1.	Vergleich der Hemmwirkung von homologem und heterologem Antiserum in vivo	35
2.2.	Antigenspezifität der Hemmung durch passiv zugeführten Antikörper	35
2.3.	Dauer der antikörpervermittelten Hemmung	36
2.4.	Zeitkinetik der Antikörperhemmung	36
2.5.	Bedeutung des Antikörper Fc Fragmentes für die Hemmung	38
3.	Hemmung der humoralen Immunantwort durch Antikörper in vitro	39
3.1.	Grundversuche in vitro	39
3.2.	Versuche zur Hemmwirkung von Zellen immunisierter Tiere auf Normalzellen in vitro	39
3.3.	Vergleich der Hemmwirkung von homologem und heterologem Antiserum in vitro	42
3.4.	Zeitkinetik der Antikörperhemmung in vitro	43
3.5.	Rekonstitution des Fc Stückes in vitro	43
3.6.	Bestimmung des Reaktionspartners für das Fc Stück des Antikörpers	45
3.7.	Targetzelle der antikörpervermittelten Hemmung	47
3.8.	Modell für den Wirkungsmechanismus der antikörpervermittelten Hemmung	48
3.9.	Vernetzung von Fc- und Antigenrezeptor als Voraussetzung der B Zellhemmung	49
3.10.	Vergleich antikörpervermittelter Hemmung bei jungen und alten Mäusen	53

D	Diskussion	55
E	Zusammenfassung	74
F	Literaturverzeichnis	76

A Einleitung

Neben in allen Spezies vorhandenen natürlichen Schranken gegenüber Fremdeinflüssen, wie sie z.B. die Haut oder Flimmerepithel des Respirationstraktes darstellen, existiert in höheren Vertebraten ein spezialisiertes Verteidigungsorgan, das Immunsystem, das ein kompliziertes biologisches Regelsystem repräsentiert.

Die Aufklärung einer Teilfunktion dieses Regelsystems war Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit.

1. Funktionelle Zweiteilung des Immunsystems:

Das spezifische Immunsystem aller höheren Vertebraten entwickelt sich aus einer pluripotenten Stammzelle. Diese Stammzellen erfahren während ihrer ontogenetischen Reifung zu immunkompetenten Lymphozyten eine funktionelle Zweiteilung unter dem Einfluß von entweder dem Thymus, der die Prägung zum T Lymphozyten bedingt, oder der bursa fabricii bei Vögeln bzw. einem homologen Organ bei anderen Vertebratenklassen, das die Prägung zum B Lymphozyten bedingt (138).

Ein der bursa entsprechendes Organ ist bei Säugern bisher nicht genau definierbar - seine funktionelle Existenz ist jedoch bewiesen.

Diese Funktion vermutet man in Verbindung mit entweder darmassoziiertem Gewebe wie Appendix, Tonsillen oder Peyer'schen Plaques (25) oder in der foetalen Leber (95).

Auch für Säuger ist somit die funktionelle Zweiteilung des Immunsystems nachweisbar.

Zur Aufgabe des humoralen Immunsystems gehört die Reaktion von B Zellen auf entsprechende Antigene, die in der Synthese und Freisetzung spezifisch gerichteter Antikörper resultiert. Diese Antikörper sind die eigentlichen Funktionsträger der humoralen Immunleistung.

Demgegenüber steht das zelluläre Immunsystem, dessen Immunleistung durch spezifische T Zellen getragen wird. Im Unterschied zu Antikörpern, die in ihrem molekularen Aufbau genau definiert sind, ist das Produkt der durch entsprechende Antigene aktivierten spezifischen T Zellen weitgehend unbekannt, obgleich mehrere Faktoren, die insgesamt als Lymphokine bezeichnet werden, beschrieben worden sind (36).

Auch ihre Funktionsweise bei der T Zellantwort ist nicht sicher bekannt, es gibt jedoch Reaktionsmuster, die auf die Aktion spezifischer T Zellen zurückgeführt werden können - wie z.B. Transplantatabstoßung (21), g-v-h-Reaktion (122), Hypersensitivität vom verzögerten Typ (137, 14), Cytotoxizität gegen virus-infizierte Zielzellen (34) etc.

2. Charakterisierung von B und T Zellen:

Die Unterscheidung zwischen T und B Lymphozyten ist morphologisch im allgemeinen nicht möglich, aber über eine Reihe unterschiedlicher Oberflächenmarker, die mit verschiedenen serologischen Techniken nachweisbar sind, kann eine Zuordnung zu einer der beiden Populationen erfolgen (100).

Lediglich B Zellen besitzen einen Oberflächenmarker, der einen direkten Bezug zu ihrer immunologischen Funktion hat - sie können in den meisten Spezies durch den Nachweis von aktiv synthetisiertem Immunglobulin in ihrer Membran charakterisiert werden (101). Weiterhin besitzen B Zellen, nicht aber T Zellen verschiedener Säugerspezies Rezeptoren für die dritte Komponente C3 bzw. ihr Spaltprodukt C3b (94).

Ein für T Zellen spezifischer Marker (bei Maus und Ratte) ist dagegen das theta antigen (106), das durch einen einzelnen Genlocus mit 2 Allelen definiert ist, sowie einige Alloantigene der Ly Serie (15).

Da die eigenen hier vorgelegten Untersuchungen die Aufklärung von Regelmechanismen der humoralen Immunantwort zum Ziel hatten, werden im folgenden die wesentlichen, bisher bekannten Grundlagen der Aktivierung von B Zellen und der dafür benötigten Interaktion mit anderen immunologischen Reaktionspartnern aufgeführt. Auf eine entsprechende Beschreibung der Aktivierungsmechanismen des T Zellsystems wird dagegen bewußt verzichtet.

3. Funktion des humoralen Immunsystems.

3.1. B Zelldifferenzierung:

Nach Antigenkontakt durchläuft die immunkompetente B Zelle verschiedene Differenzierungsstadien, die mit der Ausprägung unterschiedlicher Immunglobulinrezeptoren auf der Zellmembran einhergehen. Vor primärem Antigenkontakt tragen die B Zellen IgM Immunglobuline, später werden Immunglobulinrezeptoren der Klassen IgG, IgA und IgE gebildet. Diese sequentielle Ausbildung der Immunglobulinrezeptorklassen wurde durch Lawton et al. (73) sowie Kincade et al. (72) bestätigt.

Auch die funktionelle Transformation der immunkompetenten B Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen wird im wesentlichen durch Antigen determiniert unter Beteiligung zusätzlicher regulatorischer Zellpopulationen (s. 3.3.).

Da jeder Antikörper eine strenge Spezifität für jeweils nur eine antigene Determinante besitzt und andererseits eine nahezu unendliche Vielzahl antigenen Determinanten immunologisch beantwortet wird, beschäftigten sich eine Anzahl von Theorien mit dem biologischen Hintergrund dieser vielfältigen Spezifität.

Die weiteste Anerkennung hat heute die 'klonale Selektionstheorie' von Burnet (18) und Lederberg (74) gefunden, die auf die erste selektive Hypothese von Ehrlich (37) zurückgeht.

Das Basisprinzip dieser Theorie besteht in der Annahme, daß die Spezifität von Immunglobulinrezeptoren, die für die Erkennung von Antigenen zuständig sind, genetisch ausgeprägt ist und von der Anwesenheit von Antigen unabhängig ist.

Die Aufgabe von Antigen besteht darin, den zuständigen Zellklon funktionell zu 'selektionieren' und zur Proliferation und klonalen Expansion anzuregen.

Mitchison (84) vertiefte die klonale Selektionstheorie in seiner 'accurate sample' Hypothese, die in einigen Punkten experimentell nachvollzogen werden konnte. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß eine B Zelle nur eine Rezeptorspezifität ausbildet, d.h., daß eine Zelle nicht gleichzeitig zwei verschiedene Antigene binden kann. Weiterhin besitzt eine B Zelle im allgemeinen nur Rezeptoren mit einem bestimmten Isotyp der schweren Kette und einem Allotyp (allele Exklusion). Das Produkt einer B Zelle besitzt dieselbe Spezifität wie der membrangebundene Immunglobulinrezeptor, d.h. der sezernierte Antikörper ist ein genaues Abbild des Rezeptors.

3.2. Eigenschaften von Antigenen:

Das Immunsystem kann eine praktisch unbegrenzte strukturelle Vielfalt von Molekülen als Antigene erkennen.

Dazu gehören die meisten großen organischen Moleküle (außer Lipiden), Proteine, Polysaccharide, synthetische Polypeptide oder sogar völlig unnatürliche, durch chemische Modifikation entstandene Substanzen.

Voraussetzung für eine immunogene Eigenschaft ist eine gewisse Größe und Multivalenz. Kleine, chemisch definierte univalente Moleküle wie z.B. Dinitrophenol (DNP), die als Haptene bezeichnet werden, können zwar an spezifische Antikörper binden, sie sind aber selbst nicht in der Lage, eine Immunantwort zu induzieren. Erst durch Koppelung mehrerer DNP Determinanten an einen makromolekularen 'carrier' erhalten sie immunogene Eigenschaften.

Während eine optimale Immunantwort gegenüber den meisten natürlich vorkommenden Antigenen von der Kooperation mit anderen Zellpopulationen abhängig ist (s. 3.3.), gibt es eine Reihe von Antigenen, die B Zellen ohne diese 'Hilfe' direkt stimulieren können. Die Gemeinsamkeit dieser sogenannten thymusunabhängigen Antigene (z.B. Lipopolysaccharide, polymerisiertes Flagellin, Pneumokokkenkapselpolysaccharid) ist eine hochpolymere Struktur mit einer großen Anzahl sich wiederholender identischer Determinanten. Ein weiteres Kennzeichen dieser Antigene ist, daß sie sehr langsam katabolisiert werden und daher in vivo lange persistieren.

3.3. Zelluläre Kooperation bei der humoralen Immunantwort:

Miller zeigte 1962 (81), daß neonatale Thymektomie bei Mäusen nicht nur die zelluläre Immunreaktivität beeinträchtigt, sondern auch die Antikörperantwort gegenüber einer Reihe von Antigenen, zu denen insbesondere alle Proteine sowie heterologe Erythrozyten gehören, die daher als thymusabhängige Antigene bezeichnet werden.

Versuche von Claman (24) zeigten erstmals die Notwendigkeit für eine Kooperation zwischen T und B Lymphozyten bei der humoralen Immunantwort gegen diese Antigene.

Die Antikörperproduktion z.B. gegen Schafserythrozyten konnte in bestrahlten Tieren, die selbst nicht mehr zu einer Immunantwort in der Lage waren, nur durch gleichzeitige Gabe von Thymuszellen und Knochenmarkszellen (als Quelle für B Zellen) rekonstituiert werden, nicht aber durch Thymus- bzw. Knochenmarkszellen alleine.

Im folgenden wurde eindeutig bewiesen, daß die Antikörper nur von den B Zellen gebildet wurden, während die T Zellen eine Art Helferfunktion besaßen (28). Experimente im Hapten-Carrier System ergaben, daß auch die T Zellhilfe antigenspezifisch ist, daß jedoch B Zellen und T Zellen verschiedene Bereiche eines Antigens erkennen (102, 83). Während B Zellen vorwiegend

Haptendeterminanten erkennen, reagieren T Zellen mit Determinanten des carriers.

Welcher Teilaspekt der B Zellreaktion auf ein Antigen von der T Zellhilfe abhängt, ist noch nicht eindeutig geklärt - es scheint jedoch festzustehen, daß eine maßgebliche Funktion von T Helferzellen darin besteht, B Zellen das Signal zum "switch" von IgM zur IgG Produktion zu geben. Diese Vermutung ergab sich aus der Feststellung, daß thymusunabhängige Antigene in der Regel eine normale IgM Antikörperproduktion induzieren können, aber keine IgG Antwort und kein immunologisches Gedächtnis (69).

Bei der Induktion einer Antikörperantwort gegen thymusabhängige Antigene ist weiterhin eine dritte, nicht lymphoide Zellpopulation, die der Makrophagen, direkt beteiligt (136, 91, 56). Diese gehören grundsätzlich zu den unspezifischen zellulären Partnern des Immunsystems, deren Aufgabe in der Elimination beliebiger Antigene mittels Phagozytose besteht (107).

Es ist noch weitgehend ungeklärt, worin die Helferfunktion der Makrophagen bei der humoralen Immunantwort besteht.

Im allgemeinen werden sie für die Präsentation von Antigen in einer immunogenen Form verantwortlich gemacht (40). Nach einer Hypothese von Feldmann und Basten (41) wird das Antigen an spezifische, von T Zellen stammende Rezeptoren gebunden, die ihrerseits cytophil für Makrophagen sind und sich daher auf deren Zellmembran anlagern. Eine Beteiligung von Faktoren, die nach Antigenkontakt von Makrophagen freigesetzt werden, wird ebenfalls diskutiert (8), desgleichen die Freisetzung hochaktiver RNS-Antigenfragmente (7, 46).

In neueren Untersuchungen von Erb und Feldmann (38), wird den Makrophagen bzw. von ihnen freigesetzten Faktoren dagegen eine Rolle bei der Induktion von T Helferzellen zugesprochen. Obwohl alle bisher genannten Untersuchungen eine funktionelle Kooperation zwischen T Zellen, Makrophagen und B Zellen bestätigen, ist nicht nur der Mechanismus dieser Interaktion insgesamt ungeklärt, es sind insbesondere die Reaktionsschritte unbekannt, mit denen die B Zelle das Aktivierungssignal empfängt und verarbeitet.

Die Reaktion mit dem Antigen wird zwar im allgemeinen als Voraussetzung für eine Aktivierung angesehen, jedoch induziert sie nach Bretscher und Cohn (16) ein tolerogenes Signal, sofern nicht ein von der T Zelle stammendes Zweitsignal hinzukommt. Gegen die grundsätzliche Annahme, daß ein von der T Zelle stammendes Zweitsignal für die Aktivierung der B Zelle notwendig ist, spricht die Tatsache, daß thymus-unabhängige Antigene B Zellen in Abwesenheit von T Zellen aktivieren können.

Ein anderes Modell von Dukor und Hartmann (35) postuliert als Zweitsignal für die B Zelle neben Antigen die Interaktion der aktivierten Komplementkomponente C3 mit dem C3 Rezeptor auf B Zellen. Im Hinblick auf die thymusunabhängigen Antigene konnte gezeigt werden, daß diese die Aktivierung von C3 direkt verursachen.

Nach Daten von Schimpl et al. (115) können B Zellen zwar durch Antigen zur Proliferation veranlaßt werden - die Enddifferenzierung zu sezernierenden Plasmazellen erfolgt jedoch erst unter dem Einfluß antigenunspezifischer T Zellfaktoren (114, 60).

3.4. Mitogeninduzierte Aktivierung von B Zellen:

1972 fassten Greaves und Janossy (57) Untersuchungen über eine Reihe von unspezifischen Lymphozytenmitogenen zusammen, zu denen verschiedene pflanzliche Lectine sowie einige bakterielle Substanzen gehören. Das Interesse an diesen Substanzen war dadurch geweckt worden, daß die mitogeninduzierte Aktivierung von Lymphozyten morphologische und funktionelle Ähnlichkeit mit der antigeninduzierten Aktivierung aufwies.

Untersuchungen von Andersson et al. (3) zeigten beispielsweise, daß bakterielle Lipopolysaccharide bei der Maus selektiv auf B Zellen wirken und sowohl einen Anstieg von deren DNS Synthese als auch eine polyklonale Antikörperbildung induzieren.

Weitere Untersuchungen zeigten (71, 80), daß sich die LPS induzierte Antikörperproduktion nicht nur wie zunächst beschrieben auf die Klasse IgM beschränkt, sondern auch die Klassen IgG1, IgG2 und IgA umfasst.

Das Reaktionsmuster von B und T Zellen scheint somit genetisch vorprogrammiert und durch eine Reihe von Liganden, die an Membranrezeptoren binden, abrufbar zu sein.

Aufgrund dieser Eigenschaften werden mitogeninduzierte Reaktionen als geeignete Modelle für eine Aktivierung durch Antigen angesehen, durch die möglicherweise der Triggermechanismus für die humorale Immunantwort aufgeklärt werden könnte.

Untersuchungen zur mitogeninduzierten B Zellaktivierung veranlassten Coutinho und Möller (26) zur Aufstellung ihrer 'one nonspecific signal' Hypothese, nach der dem spezifischen Antigenrezeptor jede Fähigkeit zur aktivierenden Signalgebung abgesprochen wird. Diese Funktion soll vielmehr ein noch nicht identifizierter Mitogenrezeptor besitzen, während der Antigenrezeptor nur zur passiven Fokussierung von mitogenen Signalen auf die spezifische B Zelle dient.

3.5. Charakterisierung einer humoralen Immunantwort:

Das Ausmaß einer humoralen Immunantwort ist meßbar durch Bestimmung des Antikörperspiegels im Serum oder aber durch den Nachweis einzelner antikörpersezernierender Zellen in dem von Jerne entwickelten Plaquetest (66).

Dieser Test bietet den Vorteil, daß mit seiner Hilfe die Produktion von Antikörpern auf der Ebene von einzelnen Zellen meßbar ist, während bei der Titerbestimmung die Reaktion des Gesamtorganismus gemessen wird, dies jedoch in einer vergleichsweise weniger sensiblen Weise.

Eine normale Primärreaktion nach Erstbegegnung mit einem Antigen ist gekennzeichnet durch einen allmählichen Anstieg von IgM sezernierenden B Zellen mit einem Maximum 4-5 Tage nach Antigenkontakt. Etwa 3-4 Tage nach Antigenkontakt beginnt die Produktion von IgG Antikörpern, die an Tag 8-9 ihre höchsten Werte erreicht (62).

Es ist auffällig, daß mit dem Auftreten von IgG Antikörpern zeitlich parallel die Produktion von IgM Antikörpern nachläßt. Dieses Phänomen wird im einzelnen noch diskutiert werden.

Nach dem von Sercarz und Coons (118) entworfenen X-Y-Z Schema für die Reifung von Lymphozyten differenzieren in Abhängigkeit von der Antigendosis pro Zelle im Verlauf einer Primärantwort Vorläufer-(X) Zellen nicht nur direkt zu antikörpersezernierenden Effektor-(Z) Zellen, sondern unter 'klonaler Proliferation' auch zu sogenannten Gedächtnis-(Y) Zellen, die die Basis für die Sekundärantwort darstellen.

Die nach Zweitbegegnung mit einem Antigen ablaufende Immunreaktion unterscheidet sich quantitativ und qualitativ von der Primärantwort. Durch Antigen induziert, erfolgt ein Übergang von Gedächtnis-(Y) Zellen ins Effektor-(Z) Stadium. Die aus dem Gedächtniskompartiment abstammenden Effektorzellen sind zuständig für die Bildung von IgG. Aus diesem X-Y-Z Schema lassen sich die Charakteristika der Sekundärantwort ableiten: Schnellerer Anstieg der Antikörperproduktion (aufgrund der Vermehrung reagibler Zellen im Y Stadium) sowie eine Verschiebung der gebildeten Immunglobulinklasse zugunsten von IgG, das in einer Sekundärantwort immer etwa 90% der Gesamtantwort ausmacht.

4. Regulation der humoralen Immunantwort:

Zur Wahrung des biologischen Gleichgewichtes ist es notwendig, daß eine einmal angelaufene Immunantwort in ihrer Intensität gesteuert wird. Für diese Aufgabe stehen verschiedene natürliche Regulationsmechanismen zur Verfügung.

Da auch andere biologische Systeme negativen (und positiven) Rückkoppelungsreaktionen unterliegen, in denen Reaktionsprodukte ihre Produzenten direkt oder indirekt beeinflussen, lag es nahe, in der Regulation der humoralen Immunantwort dem Antikörper eine derartige Funktion zuzusprechen.

Bereits 1961 beschrieben Uhr und Baumann (134) den inhibitorischen Effekt von passiv appliziertem Diphtherieantitoxin auf die Immunantwort gegen gleichzeitig verabfolgtes Diphtherietoxoid. Diesen Versuchen schlossen sich eine Reihe weiterer Untersuchungen zur Hemmwirkung passiv applizierter Antikörper auf die Immunantwort an, die 1968 von Uhr und Möller (135) zusammengefaßt wurden.

Die Suppression der humoralen Immunantwort durch Antikörper erwies sich als antigenspezifisch und als abhängig von der Immunglobulinklasse. Während IgG Antikörper generell einen negativen Einfluß auf die Antikörperantwort besaßen, beschrieben Henry und Jerne (63) eine aktivierende Wirkung für IgM Antikörper.

Das Phänomen der spezifischen antikörpervermittelten Hemmung fand bereits 1966 klinische Anwendung bei der sogenannten Rhesusprophylaxe (48). Durch Gabe von anti D Serum unmittelbar nach der Geburt des ersten rhesuspositiven Kindes einer rhesusnegativen Mutter konnte eine Sensibilisierung gegen kindliches D Antigen, die zur Schädigung des nächsten rh-positiven Kindes führen würde, verhindert werden.

Der Mechanismus der antikörpervermittelten Hemmung blieb jedoch bisher ungeklärt.

Während man anfangs eine Neutralisation antigenener Determinanten durch Antikörper als alleinige Ursache der Suppression annahm ('periphere Theorie' 87, 98), zeigte sich schließlich, daß bereits so minimale Mengen an Antikörper hemmend wirken, daß eine Abdeckung aller antigenener Determinanten als alleinige Erklärung der Hemmwirkung ausgeschlossen ist.

Rowley und Fitch (109) postulierten daher, daß der Antikörper eine direkte Wirkung auf immunkompetente Zellen ausübt ('zentrale Theorie'). Diese Theorie ist heute die allgemein anerkannte, und sie wurde in den folgenden Jahren durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt und erweitert (108, 42, 123).

Eine zusätzliche Beteiligung peripherer Hemmechanismen ist jedoch keinesfalls ausgeschlossen.

1970 wurde eine weitere Möglichkeit zur Regulation der humoralen Immunantwort durch die Entdeckung der sogenannten T suppressor Zellen aufgezeigt (51, 53), wodurch die Untersuchungen zur antikörpervermittelten Immunregulation etwas in den Hintergrund gedrängt wurden.

T suppressor Zellen waren in verschiedenen Nachweissystemen in der Lage, B Funktionen, d.h. die Antikörperproduktion, zu hemmen. Zunächst schien unklar, ob die T suppressor Zelle ein Frühstadium in der Differenzierung zur T Helferzelle darstellt (70) oder ob sie die Aktion einer eigenen Subklasse widerspiegelt. Mittlerweile hat sich die Ansicht durchgesetzt, daß T suppressor Zellen eine Subklasse von T Zellen darstellen, die sich auch hinsichtlich der Ly-Oberflächenmarker von T Helferzellen unterscheiden lassen (20).

Auch die T zellvermittelte Suppression der Antikörperantwort ist antigenspezifisch - dagegen herrscht über den zugrundeliegenden Mechanismus noch keine Einigkeit.

Die Mehrzahl der Arbeitsgruppen halten die T Helferzelle für die Zielzelle der T-Suppression (130, 52, 59), so daß die zu beobachtende Verminderung der Antikörperbildung primär auf einer reduzierten Helferfunktion beruht. Es existiert aber auch die Vorstellung, daß T suppressor Zellen direkt auf B Zellen wirken können (120).

5. Eigene Fragestellung:

Im Rahmen der eigenen Fragestellung sollte der Mechanismus der antikörpervermittelten Hemmung der humoralen Immunantwort näher abgeklärt werden. Der komplexe Mechanismus der Immunregulation wurde hierbei bewußt auf die Fragestellung eingeengt, ob und in welcher Weise Antikörper die Funktion von B Zellen im Sinne der beschriebenen Rückkoppelungsmechanismen hemmen können.

Auf die Untersuchung der grundsätzlich möglichen Beteiligung anderer Reaktionspartner an der Hemmung von B Zellen (z.B. T suppressor Zellen, Makrophagen) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bewußt verzichtet.

B Material und Methoden

I. Material:

1. Versuchstiere: Inzuchtmäuse der Stämme CBA/J, CBA/H, C57Bl/6 (Bomholtgard, Ry, Dänemark, oder Ivanovas, Kisslegg) F1 Hybriden C57Bl/6 x A (eigene Zucht mit Elterntieren von Bomholtgard) sowie nicht ingezüchtete NMRI Mäuse (eigene Zucht) wurden im Alter von 6 - 10 Wochen verwendet. Die Tiere wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten.

Für die Gewinnung von Antiseren wurden außerdem Kaninchen und Meerschweinchen (lokale Zucht) verwendet.

2. Antigen: Als Antigen für die Bestimmung der Immunantwort in vivo und in vitro wurden Schafserthrozyten (SRBC) der Firma BAG Lich verwendet. Sie wurden steril in Alsever Lösung für maximal 3 Wochen aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch dreimal in Ringerlösung gewaschen.

3. LPS: Lipopolysaccharid von *serratia marcescens* (Behringwerke Marburg) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ringerlösung aufgenommen und 15 min. im Wasserbad gekocht. Die LPS Gabe in vivo erfolgte in einer Konzentration von 200 µg in 200 µl i.p. - in vitro wurden pro Ansatz 50 µg im Marbrook Kultursystem bzw. 25 µg pro Vertiefung im Mishell Dutton System verwendet.

II. Methoden:

1. Plaqueassay:

1.1. Immunisierung: Alle in vivo Immunisierungen wurden mit 5×10^8 SRBC in 0.5 ml Volumen intraperitoneal (i.p.) durchgeführt.

1.2. Herstellung der Milzzellsuspension für den Plaquetest: Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet, die Milzen entnommen und in Glashomogenisatoren (Braun Melsungen) mit

Teflon beschichteten Kolben suspendiert. Die Zellsuspension wurde dreimal in Ringerlösung gewaschen und anschließend in 2 ml PFC-Medium aufgenommen.

1.3. Zellzählung: Die Milzzellsuspension wurde zunächst in 0.84 %ige NH_4Cl Lösung pipettiert und 5 min. stehen gelassen, im Erythrozyten zu lysieren (39). Anschließend wurde die Suspension mit Trypanblau (0.2 %ig und nochmals 1:5 verdünnt) versetzt, das in tote Zellen aufgenommen wird, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Die Suspension wurde in einer Neubauerkammer bei 160-facher Vergrößerung ausgezählt und auf die erforderliche Zahl lebender Zellen eingestellt.

1.4. PFC (plaque forming cells) Medium:

100 ml MEM mit Hanks Salzen, 10 x konzentriert (Flow Laboratories) wurden mit aqua dest. auf 1000 ml verdünnt. Vor Zugabe des aqua dest. wurden folgende Zusätze beigelegt (die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Gesamtvolumen von 1000 ml):

1 % L-Glutamin 200 mM

1 % non-essential amino acids

1 % Pyruvat

1 % MEM amino acids

Flow Laboratories

5 % fetales Kälberserum (FKS) (Rehatuin batch 268, Reheis Chemical Company)

Das Medium wurde in 100 ml Portionen eingefroren und vor Gebrauch wurde Natriumbikarbonat (7.5 %, Flow Laboratories) zugesetzt bis ein pH von 7.2 erreicht war.

1.5. Bestimmung der Anzahl antikörperproduzierender Zellen im Plaquetest:

Jeweils 4 Tage nach der letzten Immunisierung mit SRBC wurden die Milzzellen der Testtiere im Plaquetest nach Cunningham und Szenberg (27) auf ihre Fähigkeit zur Antikörperbildung untersucht. Dafür wurden 200 μl der Milzzellsuspension mit

50 μ l frischem Meerschweinchen Serum als Komplementquelle und 200 μ l SRBC (1×10^9 /ml) versetzt. Mit einer 1 ml Tuberkulinspritze wurde die Mischung zwischen zwei Objektträger eingefüllt, die an den Schmalseiten mit doppelseitig klebendem Tesaband zusammengeklebt waren. Das eingefüllte Volumen wurde notiert, die Objektträger mit Paraffin verschlossen und 1 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit verursachten Antikörper, die von sensibilisierten Lymphozyten radial in den umgebenden Erythrozytenrasen diffundierten, Lysehöfe (Plaques). Jeder Plaque repräsentierte dabei eine antikörpersezernierende Einzelzelle. Pro Ansatz wurden die Plaques von 2 Objektträgern addiert. Mit dem bisher beschriebenen Ansatz konnten nur IgM PFC nachgewiesen werden. Zum Nachweis der sonst nicht hämolytisch wirksamen IgG Antikörper mußten noch 25 μ l eines anti Maus γ Globulinserums der Zellsuspension zugesetzt werden, das die Hämolysefähigkeit der IgG Antikörper steigerte. Berechnung der Anzahl plaquebildender (PFC) Zellen: Nach folgender Formel wurde die Anzahl PFC pro Milz bestimmt

$$\frac{\text{gezählte Plaques} \times \text{Verdünnung} \times 2.25 (2.375^*) \times 1000}{\text{eingefülltes Volumen}}$$

* bei der Bestimmung von IgG Plaques wird statt des Faktors 2.25 der Faktor 2.375 eingesetzt.

Unter Berücksichtigung der ermittelten Zellzahl pro Milz kann auf die Anzahl PFC pro 10^6 Milzzellen umgerechnet werden.

1.6. Austestung des anti Maus γ Globulinserums (Behringwerke Marburg):

Zunächst wurde an Milzen sekundärimmunisierter Tiere ausgetestet, bis zu welcher Verdünnung des Antiserums noch deutliche Plaques erkennbar waren. Da anti Maus γ Globulinserum einen Teil der IgM PFC hemmt, wurde in dem folgenden Ansatz ausgetestet, wie hoch der Prozentsatz der Hemmung einer bestimmten

1:10 verdünnten Antiserumcharge lag. Dafür wurden Mäuse 1 Tag nach Immunisierung getötet und ihre Milzen im Plaqueansatz für IgM und IgG PFC getestet. Da 1 Tag nach Immunisierung noch keine IgG PFC gebildet sein können, müssen alle in beiden Ansätzen nachweisbaren Plaques von IgM PFC stammen. In dem Ansatz mit anti Maus Globulin zeigten sich jedoch nur noch 18 % der Plaques des Ansatzes ohne Antiserum - somit waren 82 % der IgM PFC durch Das Antiserum gehemmt worden. In einem Plaquetest 4 Tage nach Immunisierung, in dem bei einer Primärantwort ca. 10 - 20 % der Gesamtantwort IgG Plaques sind, muß man daher die Kontamination von 18 % IgM Plaques abziehen, um die reinen IgG Plaques zu erhalten.

2. Herstellung von Zellsuspensionen für Zelltransfer und in vitro Kulturen:

2.1. Milzzellsuspension:

Milzen von 6 - 8 Wochen alten syngeneten Tieren wurden steril entnommen, gepoolt und durch feinmaschige Siebe in Petrischalen mit MEM gepreßt. Grobe Partikel ließ man 3 min. absedimentieren und nahm den Überstand als Einzelzellsuspension ab.

Danach wurde die Zellsuspension dreimal in Medium gewaschen und auf die benötigte Anzahl lebender Zellen eingestellt.

2.2. Gewinnung von Makrophagen:

Als Quelle für Makrophagen dienten peritoneale Exudatzellen von nichtvorbehandelten Mäusen, die durch Spülung der Peritonealhöhle mit MEM mit 5 Einheiten Heparin/ml gewonnen wurden. Die Ausbeute an Makrophagen betrug ca. 70-80 % der gewonnenen Peritonealzellen.

2.3. Gewinnung von T Zellen: Eine Anreicherung von T Zellen wurde durch Filtration über Nylonwolle (Fenwal Laboratories) nach der Methode von Julius et al. (67) erreicht. Eine 12 ml

Spritze wurde mit 0.6 g steriler Nylonwatte gefüllte, mit MEM + 5 % FKS vorinkubiert (30 min bei 37° C) und anschließend mit 100-200 x 10⁶ Zellen in 2 ml Medium beladen. Nach einer Inkubationszeit von 45 min. bei 37° C wurde mit 25 ml Medium eluiert. Das Eluat, das ca. 20 % der ursprünglich aufgetragenen Lymphozyten enthielt wurde zweimal gewaschen und auf die benötigte Zellzahl eingestellt.

2.4. Entfernung adhätierender Zellen:

Zur Entfernung von Makrophagen wurde deren Eigenschaft ausgenutzt, sich an Plastikmaterial anzuheften. 10⁷ Zellen in 10 ml MEM wurden in Plastik Kulturschalen (Greiner, Nürtingen 16/50 1 Stunde bei 37° C im CO₂ Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die nichtadhätierenden Zellen abgespült, auf frische Kulturschalen übertragen und für eine weitere Stunde inkubiert. Nichtadhärente Zellen wurden schließlich gepoolt, abzentrifugiert und auf die erforderliche Zellzahl eingestellt.

2.5. Entfernung von T Zellen (55, 132)

Zur Elimination von T Zellen wurde anti Maus Hirnserum (anti-theta Serum) nach der Methode von Golub (55) gewonnen. Das Serum wurde für 30 min bei 56° C inaktiviert und auf Leber der zu testenden Mäusestämme adsorbiert. Es wurde in einer Verdünnung von 1:4 benutzt, welche im Testansatz zusammen mit Komplement (Meerschweinchen Serum) 98 % Thymuszellen und 30-40 % Milzzellen abtötete, während die PFC Bildung unbeeinflusst blieb.

1 ml Zellsuspension (100 x 10⁶ Zellen) wurden mit 2 ml anti-theta Serum und 2 ml Meerschweinchen Serum (adsorbiert an Niere und Milz) 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Jeweils vor und nach der anti-theta Behandlung wurde der Prozentsatz toter Zellen bestimmt. Nach Inkubation und Waschschritten wurde die Suspension auf die benötigte Anzahl lebender Zellen eingestellt.

2.6. Herstellung Fc rezeptorfreier Zellsuspensionen:

2.6.1 Herstellung von sensibilisierten Erythrozyten (EA):

SRBC (1×10^9 /ml) wurden im Verhältnis 1:1 mit Kaninchen - IgG-anti SRBC Serum (s. Kap. 3.1., 1:100 verdünnt) für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde dreimal in MEM gewaschen und die Erythrozyten auf 5×10^8 /ml eingestellt.

2.6.2 Fc Rosettenbildung: 100 μl Zellsuspension (25×10^6 /ml) wurden mit 100 μl EA und 0.5 ml Ringerlösung für 15 min bei Zimmertemperatur inkubiert (88). Die Zellen wurden bei 100 g zentrifugiert, vorsichtig aufgeschüttelt und mit 3 Tropfen Methylenblau versetzt, das die Lymphozyten anfärbte. Die Suspension wurde in eine Plaquekammer (s. Kap. 1.5.) eingefüllt und bei 400-facher Vergrößerung auf die Anzahl rosettenbildender Zellen getestet, wobei als Fc positiv nur Zellen gewertet wurden, die von mindestens 3 Erythrozyten umgeben waren.

2.6.3 Abtrennung von Fc rosettenbildenden Milzzellen:

Mit geringen Abwandlungen wurde die von Berman und Weigle beschriebene Methode verwendet (13).

200 μl Zellsuspension (100×10^6 /ml) wurden mit 5 ml EA für 5 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 5 min. bei 100 g zentrifugiert, dekantiert und das Pellet 30 min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurde es vorsichtig mit 2 ml MEM resuspendiert. Je 4 ml Suspension wurden auf einen Ficoll/Isopaque Gradienten (spez. Dichte 1077) gegeben und für 20 min. bei 1000 zentrifugiert.

Dadurch sedimentierten rosettierte Zellen ab, während die nichtrosettierten, d.h. 'Fc rezeptorfreien' (Fc^-) Zellen in der Interphase verblieben. Zur Isolation von Fc rezeptorpositiven (Fc^+) Zellen aus dem Sediment wurde dieses zweimal nacheinander für jeweils 15 sek. einem hypoosmolaren Schock unterworfen, wodurch die Erythrozyten lysiert wurden, während die Lymphozyten davon nicht beeinflusst wurden.

3. Antiseren:

3.1. Gewinnung von Antiserum gegen SRBC:

Zur Gewinnung von homologem anti SRBC Serum wurden Mäuse 4-6 mal mit jeweils 5×10^8 SRBC i.p. immunisiert.

4 Tage nach der letzten Immunisierung wurden sie aus dem retroorbitalen Plexus entblutet. Das Serum wurde abzentrifugiert und 30 min. bei 56°C inaktiviert.

Heterologes anti SRBC Serum wurde nach 4-6 maliger Immunisierung von Kaninchen mit jeweils 1×10^9 SRBC i.v. gewonnen. 4 Tage nach der letzten Immunisierung wurden sie aus einer marginalen Ohrvene geblutet. Nach Zentrifugation wurde das Serum ebenfalls gepoolt und 30 min. bei 56°C inaktiviert.

3.2. Bestimmung des Hämagglutinationstiters (Mikromethode (119)):

In eine Mikrotiterplatte mit U-förmigen Vertiefungen wurden 25 μl eines 1:100 verdünnten Kaninchennormalserums vorpipettiert. In die Vertiefungen der untersten Reihe wurden dazu je 25 μl der zu testenden Antiseren gegeben und mit geeichten Titerquirlen (Microdiluter, Cooke Instruments, Zollikon) wurden jeweils 25 μl Volumina in die nächsthöhere Reihe übertragen, so daß eine serielle Verdünnungsreihe entstand. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Serumzusatz bzw. mit Zusatz von Normalserum verwendet. In jede Vertiefung wurden zuletzt 25 μl einer 2 %igen SRBC-Lösung gegeben. Die Titerplatten standen 1 Stunde bei Zimmertemperatur und wurden dann über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Zum Ablesen des Hämagglutinationstiters wurden die Platten in einem Winkel von 45° schräg gestellt, so daß die Erythrozyten zu fließen begannen. Ansätze ohne Zusatz von anti SRBC Serum zeigten eine homogene Fließzone, während in den Ansätzen mit Antiserum diese Homogenität durch Agglutination der Erythrozyten gestört war. Als letzte positive Titerstufe wurde diejenige Antiserumverdünnung angegeben, bei der gerade noch keine homogene Fließzone nachweisbar war.

Das nach der obigen Beschreibung gewonnene homologe Antiserum besaß einen Agglutinationstiter von 1:4096 (im natürlichen Logarithmus ausgedrückt $\ln 11$), für das heterologe Antiserum ergab sich ein Titer von 1:2048 ($\ln 10$).

3.3. Isolierung der IgG Fraktion:

Beide Antiseren wurden zunächst zur Entfernung von Begleitproteinen mit 33 % Ammoniumsulfat gefällt und anschließend gegen 0.015 M Phosphatpuffer dialysiert (116). Die IgG Fraktion wurde durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose (Pharmacia) gewonnen (64). Durch Behandlung mit 2 M NaSCN wurde die IgG Fraktion von der Säule eluiert, anschließend gegen 0.015 M Phosphatpuffer (15 mM NaCl) dialysiert und ankonzentriert.

Die Reinheitsprüfung erfolgte durch Immunelektrophorese gegen Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Serum sowie Anti-Maus- und anti-Kaninchen-IgG. Es ergab sich jeweils nur eine Einzelbande, die der Präzipitationslinie des reinen anti IgG Serums entsprach. Die anschließende Titerbestimmung ergab für das homologe und das heterologe IgG Antiserum jeweils einen Wert von $\ln 9$.

3.4. Immunelektrophorese:

Objektträger wurden mit 1 %iger Agarose beschichtet, in die nach Erkalten 2 Löcher eingestanzt wurden. In diese wurden ca. 10 μ l des zu testenden Serums eingefüllt. Darauf erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung für 2 Stunden bei 250 V. Anschließend wurde zwischen den beiden Probenlöchern ein Graben ausgestanzt, in den Antiserum eingefüllt wurde. Die Objektträger wurden für 20-24 Stunden bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend zur Entfernung nicht präzipitierter Proteine zunächst 48 Stunden in 1 %iger NaCl und dann 2 Stunden in Leitungswasser aufbewahrt. Nach Trocknen der Objektträger erfolgte die Anfärbung der Präzipitationsbanden mit Coomassieblau.

3.5. Duchterlony Immundiffusion:

Auf agarosebeschichteten Objektträgern (s.o.) wurden Löcher ausgestanzt und 10 μ l des zu testenden Serums in verschiedenen Verdünnungen eingefüllt, das gegen das entsprechende Antiserum (10 μ l) getestet wurde. Während einer 24-stündigen Inkubation bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer erfolgte die Präzipitationsreaktion. Nach Waschschritten und Trocknen (s.o.) wurden die Präzipitationslinien ebenfalls mit Coomassieblau angefärbt.

3.6. Passive Immunisierung mit anti SRBC Serum in vivo:

Anti SRBC Seren wurden in einem Volumen von 0.2 ml i.p. 1 bis 2 Stunden vor Antigen injiziert.

3.7. Herstellung von F(ab)₂ Fragmenten der Kaninchen anti SRBC IgG Fraktion:

F(ab)₂ Fragmente des Kaninchen anti SRBC Serums wurden von Dr. Botzenhardt durch Pepsinspaltung nach der Methode von Nisonoff (93) gewonnen. Die Reinheit der Präparationen wurde immunoelektrophoretisch überprüft.

3.8. Gewinnung von Antiserum gegen F(ab)₂ anti SRBC Fragmente:

Meerschweinchen wurden 4-6 mal mit je 1 ml anti SRBC-F(ab)₂ Fragmenten vom Kaninchen intracutan in die Fußsohlen gespritzt. 4 Tage nach der letzten Immunisierung wurden sie entblutet, das Serum wurde abzentrifugiert und bei 56° C für 30 min. inaktiviert. Die IgG Fraktion wurde durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose isoliert. Zur Bestimmung des Agglutinationstiters wurden F(ab)₂ Fragmente in einer subagglutinatorischen Verdünnung an SRBC gekoppelt. Mit Hilfe dieses Indikatorsystems wurde für das anti F(ab)₂ Serum ein Titer von $\ln 10$ ermittelt.

3.9. Proteinbestimmung (77):

200 µl des zu testenden Serums wurde mit 1 ml Folin A Reagenz versetzt und 10 min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Folin Ciocalteus Reagenz zugegeben und weitere 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Extinktion der Probe bei 660 Nanometer gemessen und der Proteingehalt anhand einer Eichkurve ermittelt.

3.10. Aggregation von Human-(HGG) und Rindergammaglobulin (BGG):

HGG bzw. BGG (Biotest) wurde durch Inkubation bei 63⁰ C für 30 min. aggregiert (13).

3.11. Fluoreszenzserologischer Nachweis der Bindung von aggregiertem Gammaglobulin an Lymphozyten:

2×10^6 Mausmilzzellen wurden für 30 min. bei Zimmertemperatur mit 50 µl aggregiertem oder nichtvorbehandeltem Gammaglobulin-inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in Ringerlösung gewaschen und das Pellet mit 25 µl fluoreszenzkonjugiertem anti Humanglobulin 1:10 verdünnt (Behringwerke Marburg) für weitere 30 min. bei 4⁰ C inkubiert. Nach drei darauffolgenden Waschschritten wurde der Überstand bis auf ca. einen Tropfen abgesaugt und die Zellen auf einen Objektträger ausgestrichen. Unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) wurden mindestens 200 Lymphozyten ausgezählt und der Prozentsatz fluoreszierender Zellen bestimmt.

4. In vitro Kultursysteme:

4.1. Marbrook System (79):

Dieses Kultursystem wurde nach den Angaben von Dr. Erb (Basel) modifiziert. 15×10^6 Milzzellen in 0.5 ml Kulturmedium wurden zusammen mit 3×10^6 SRBC in 0.5 ml Kulturmedium in Glaseinsätze pipettiert, die mit Dialysemembran verschlossen waren. Diese Glaseinsätze wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben

eingesetzt, die mit ca. 25 ml Außenmedium (s.u.) soweit gefüllt wurden, daß der Flüssigkeitsspiegel des Außenmediums dem in den Glaseinsätzen entsprach. Die Erlenmeyerkolben wurden mit nichttoxischen Gummistopfen (Tecnomara, Zürich) verschlossen und 4 Tage in einem mit 5 % CO_2 begasten Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet, gewaschen, in 1 ml Medium suspendiert und in einem modifizierten Plaquetest getestet.

Dafür wurden 100 μl der Zellsuspension + 75 μl Medium + 25 μl Meerschweinchen Serum + 25 μl 20 %ige SRBC gemischt, in Plaquekammern eingefüllt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Multiplikation der gezählten Plaqueswerte pro Ansatz mit dem Faktor 10 ergab die Plaques pro Kultur.

Marbrook Kulturmedien:

Waschmedium und Außenmedium: MEM mit Earles Salzen (Gibco) + 1 % L-Glutamin + 5 % FKS, mit Bikarbonat auf pH 7.2 eingestellt.

Kulturmedium:

Nach den Waschvorgängen wurden Milzzellen und SRBC in MEM mit Earles Salzen (s.o.), das statt mit Bikarbonat mit 20 mM Hepes (Gibco) gepuffert war, aufgenommen. Der pH Wert von 7.2 wurde mit 2 N NaOH eingestellt.

4.2. Mishell Dutton System (82):

Dieses System wurde in einer Modifikation als Mikromethode ebenfalls von Dr. Erb (Basel) übernommen.

1×10^6 Milzzellen (in 100 μl Medium) wurden 6×10^5 SRBC (in 100 μl Medium) in Mikrokulturplatten mit flachem Boden (Greiner, Nürtingen) kultiviert. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls 4 Tage bei 37°C im CO_2 Brutschrank. Alle 24 Stunden wurden die Zellen mit Cocktailmedium (s.u.) gefüttert. Nach 4 Tagen wurden die Kulturplatten zentrifugiert, dekantiert und mit 200 μl frischem Medium pro Vertiefung gefüllt. Pro Versuchsgruppe wurden 9 Parallelkulturen angesetzt, von denen für den Plaquetest jeweils 3 Ansätze gepoolt wurden.

Kulturmedium:

MEM mit Earles Salzen + 1 % L-Glutamin, + 5 % FKS, Bikarbonat und 2.5×10^{-5} M Mercaptoäthanol.

Cocktailmedium:

100 ml MEM mit Earles Salzen + Bikarbonat

7.2 ml non essential amino acids mixture

7.2 ml L-Glutamin 200 mM

21.4 ml Natriumbikarbonat 7,5 %

2.9 ml Dextrose 50 % (Merck)

} Gibco

Vor Gebrauch wurden zu zwei Volumenteilen Cocktailmedium

1 Volumenteil FKS zugemischt.

C Ergebnisse:

1. Hemmung der humoralen Immunantwort durch B Zellen
("B suppressor Zellen")
- 1.1. Zusammenfassung vorausgegangener Untersuchungen
zur Hemmung der humoralen Immunantwort durch
Transfer hyperimmuner Milzzellen

Die ersten Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sollten die Untersuchungen von Witzenhäusen (Dissertation 1975 (140) weiterführen und ergänzen, in denen erste Hinweise auf negative Rückkoppelungsmechanismen des humoralen Immunsystems erhalten wurden.

Diese Untersuchungen werden im folgenden kurz zusammengefaßt. Witzenhäusen hatte gezeigt, daß man durch Transfer von Milzzellen zweifach mit Schafserythrozyten (SRBC) immunisierter Spendertiere auf normale syngenetische Empfänger eine Hemmung von deren Immunantwort gegenüber SRBC erhalten kann.

Durch einen Plaquetest des Spendermilzzellmaterials vor Transfer konnte die Anzahl IgM- und IgG bildender Zellen im Transfermaterial bestimmt werden. Waren die Spendertiere nur einmal immunisiert, so zeigten sich im Plaquetest zum Zeitpunkt des Transfers 90 % IgM PFC und nur 10 % IgG PFC, während bei zweimal immunisierten Spendern der Plaquetest 90 % IgG PFC und nur 10 % IgM PFC ergab.

Durch entsprechende Verdünnungen der Spendermilzzellsuspension vor Transfer konnte Witzenhäusen Dosiswirkungskurven für die übertragene Zellsuspension aufstellen. Dabei zeigte sich, daß die Übertragung von Milzzellmaterial einmal immunisierter Spender (das vorwiegend IgM bildende Zellen enthält) die Immunantwort der Empfänger nicht negativ beeinflusste.

Tab. 1. Erst bei Übertragung von extrem hohen Zelldosen (10^9 Zellen) machte sich eine Suppression der PFC Werte im Empfänger bemerkbar. Dagegen bewirkte die Übertragung von Milzzellen zweifach immunisierter Spender (die vorwiegend IgG

Gruppe	Transfermaterial Zellzahlen			PFC in den Empfängern 5 Tage nach Testimm.	
	Gesamt	IgM	IgG	IgM/10 ⁶	IgG/10 ⁶
K	-	-	-	220	570
Trf.I	7.7x10 ⁸	1.5x10 ⁵	1.3x10 ⁴	480	422
II	1.5x10 ⁹	3x 10 ⁵	2.7x10 ⁴	563	312
III	3x10 ⁹	6x10 ⁵	5.4x10 ⁴	393	174
IV	6x10 ⁹	1.2x10 ⁶	1.8x10 ⁵	370	57

Tab.1 Einfluß von Milzzellen einmal immunisierter Spender auf syngene, unbehandelte Empfänger.

Gruppe	Transfermaterial Zellzahlen			PFC in den Empfängern 5 Tage nach Testimm.	
	Gesamt	IgM	IgG	IgM/10 ⁶	IgG/10 ⁶
K	-	-	-	2810	3753
Trf.I	1.6x10 ⁴	2	30	2160	390
II	8x10 ⁴	12	150	2260	530
III	4x10 ⁵	63	800	1720	254
IV	2x10 ⁶	320	4x10 ³	125	44
V	1x10 ⁷	3.4x10 ³	4x10 ⁴	27	303
VI	2x10 ⁷	6.8x10 ³	8x10 ⁴	23	293
VII	4x10 ⁷	1.4x10 ⁴	1.6x10 ⁵	19	220
VIII	8x10 ⁷	2.7x10 ⁴	3.2x10 ⁵	17	54
IX	1.6x10 ⁸	5.4x10 ⁴	6.4x10 ⁵	7	97

Tab.2 Einfluß von Milzzellen zweimal immunisierter Spender auf syngene, unbehandelte Empfänger.

bildende Zellen enthalten) schon in geringen Mengen eine deutliche Suppression der Empfängerantwort. Tab. 2. Bereits die Übertragung von $1,6 \times 10^4$ Zellen, das entsprach 30 nachweisbaren IgG bildenden Zellen, verursachte eine deutliche Hemmung der Empfänger PFC Antwort, die sich parallel zur Zunahme der transferierten IgG bildenden Zellen verstärkte bis hin zur völligen Reaktionsunfähigkeit.

An diesem Punkt setzten die ersten Versuche der hier vorgelegten Arbeit ein. Witzenhausens Ergebnisse ließen vermuten, daß es sich bei den suppressiv wirkenden Zellen im Transfermaterial um IgG bildende B Zellen handelte. Dies mußte jedoch weiter bestätigt werden, da die beobachtete Parallelität der Hemmwirkung mit Zunahme der transferierten IgG bildenden Zellen nicht die Aktion anderer suppressiver Zellen wie Makrophagen oder T Zellen ausschließen konnte.

1.2. Übertragung normaler Milzzellen

Als Kontrollansatz wurde zunächst die Auswirkung einer Übertragung von Milzzellen nicht immunisierter Spender auf syngene Empfänger untersucht. Milzzellen unbehandelter Spender wurden auf syngene Empfänger übertragen. 4 Tage bzw. 9 Tage nach Transfer erhielten diese Empfänger sowie eine unbehandelte Kontrollgruppe Testimmunisierung und 4 Tage darauf wurden die Milzen entnommen und im Plaquetest untersucht.

Tab. 3 zeigt, daß zu beiden Testzeitpunkten die Reaktivität der Empfänger normaler Milzzellen gegenüber der Reaktivität der Normalkontrolle erhöht war.

	4 Tage nach Transfer		9 Tage nach Transfer	
	IgM PFC/ 10^6	IgG PFC 10^6	IgM PFC/ 10^6	IgG PFC/ 10^6
Kontrolle	3200	500	1100	750
Empfänger normaler Milz	6700	650	2070	1070

Tab. 3. Übertragung normaler Milzzellen

Die Ursache dieser Vermehrung von PFC pro standardisierter Zellzahl ist nicht bekannt - eine weitere Abklärung dieses Phänomens war im Rahmen dieser Untersuchungen auch nicht beabsichtigt.

Das Experiment zeigt jedoch deutlich, daß die von Witzenhausen beobachtete Suppression nach Milzzelltransfer nicht auf einen unspezifischen Einfluß von übertragenen Zellen schlechthin zurückgeführt werden kann - sie war lediglich zu beobachten, wenn die Spendertiere hyperimmunisiert waren.

1.3. Charakterisierung der suppressiven Zellpopulation:

Zum Ausschluß von T Zellen und Makrophagen wurde die Spendermilzzellsuspension vor Transfer entweder mit anti-theta Serum + Komplement behandelt oder sie wurde zweimal in oberflächenbehandelten Plastikpetrischalen inkubiert, um die adhärierende Zellpopulation zu entfernen (s. Methoden).

Auf syngene unbehandelte Empfänger wurden jeweils 100×10^6 Milzzellen von zweifach immunisierten Spendern übertragen, die entweder nicht vorbehandelt waren, oder aus denen T Zellen bzw. Makrophagen bzw. beide Zellpopulationen entfernt worden waren. 3 Tage nach dem Transfer erhielten die Empfänger-tiere sowie eine nichtvorbehandelte Kontrollgruppe Testimmunsierung mit SRBC und 4 Tage danach wurde die PFC Antwort der 4 Gruppen bestimmt.

Tab. 4 zeigt die erhaltenen PFC Werte, in % der Normalkontrolle ausgedrückt. Der Transfer von Milzzellen zweifach immunisierter Spender resultierte in einer stark supprimierten Immunantwort der Empfänger unabhängig davon, ob die Milzzellen vorher von T Zellen, Makrophagen oder beiden Populationen zusammen befreit worden waren. Dadurch ließ sich die Vermutung bestätigen, daß es sich bei den Effektorzellen der von Witzenhausen beschriebenen Suppression tatsächlich um IgG bildende B Zellen handelt.

Transfer von:	PFC/ 10^6	%
-	2500	100
2 x immun. Milz- zellen	75	3
2 x immun. Milz- zellen-Makrophagen	120	5
2 x immun. Milz- zellen (anti $\ominus$ + C)	40	2
2 x immun. Milz- zellen-Makrophagen (anti $\ominus$ + C)	40	2

Tab. 4: Charakterisierung der suppressiven Zellpopulation

Jeweils 100×10^6 hyperimmune Milzzellen, wurden entweder unvorbehandelt oder nach Entfernung von Makrophagen, bzw. T Zellen bzw. beiden Zellpopulationen zusammen, auf syngene, unbehandelte Empfänger übertragen. 3 Tage nach Transfer erfolgte die Testimmunisierung mit SRBC und 4 Tage später wurde die PFC Antwort (IgM + IgG) der 4 Testgruppen sowie die einer Normalkontrollgruppe ermittelt.

1.4. Antigenspezifität der B zellvermittelten Suppression:

Im folgenden Versuchsansatz wurde überprüft, ob der suppressive Effekt Übertragener IgG bildender B Zellen antigenspezifisch ist, d.h. ob er sich auf das zur Immunisierung verwendete Antigen beschränkt oder ob auch die Reaktionsbereitschaft gegenüber einem nicht kreuzreagierenden Antigen beeinträchtigt ist.

Dazu wurden Tiere, die 100×10^6 Milzzellen von zweifach immunisierten Spendern erhalten haben, entweder mit SRBC oder mit Kaninchenerythrozyten immunisiert und die Immunantwort mit den jeweiligen Kontrollgruppen, die nur SRBC bzw. KaRBC erhalten haben, verglichen.

Tab. 5 zeigt, daß der Transfer SRBC immuner Milzzellen zwar ein völliges Reaktionsunvermögen gegenüber SRBC zur Folge hat, daß aber die PFC Antwort gegenüber KaRBC nicht negativ beeinflusst ist.

	IgM/ 10^6	
	SRBC	KaRBC
Kontrolle	1200	600
Transfer- gruppe	20	500

Tab. 5: Antigenspezifität der B zellvermittelten Suppression

Somit ist erwiesen, daß IgG bildende B Zellen nach Transfer in einen syngeneten Empfänger dessen Immunantwort antigen-spezifisch supprimieren.

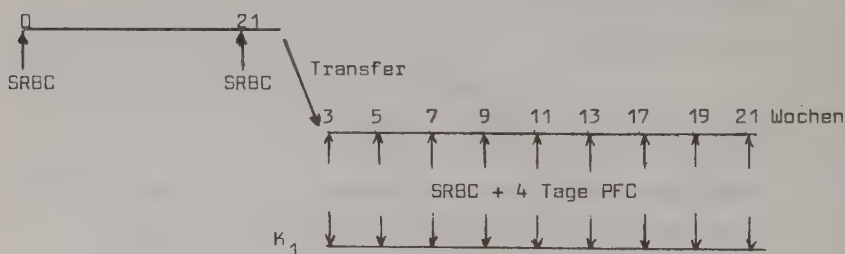
1.5. Dauer der B Zellvermittelten Suppression:

Es ergab sich nun die Frage, wie lange der Suppressionseffekt in den Empfängern nachweisbar sein würde, bzw. wie lange die Spendermilzzellen ihre suppressive Potenz behalten.

1.5.1 Dauer der Suppression im Empfänger:

100×10^6 Milzzellen von zweifach immunisierten Spendern wurden 3 Tage nach der letzten Immunisierung auf unbehandelte, syngene Empfänger übertragen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach diesem Transfer wurden Gruppen von Empfängertieren sowie Kontrolltiere testimmunisiert, und 4 Tage danach wurde ihre Immunantwort im Plaquetest untersucht (s. Schema 1).

Schema 1



Das Resultat dieses Langzeitversuches zeigt Abb. 1.

Bis zu 9 Wochen nach Zelltransfer waren die Empfängertiere in ihrer Immunantwort gegenüber SRBC praktisch vollständig gehemmt. Erst 21 Wochen nach dem Zelltransfer erreichten sie wieder PFC Werte, die denen der Kontrollgruppe entsprachen.

1.5.2 Dauer der suppressiven Wirkung des Spendermaterials:

100×10^6 Milzzellen von zweifach immunisierten Spendern wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der zweiten Immunisierung auf syngene, unbehandelte Empfänger übertragen.

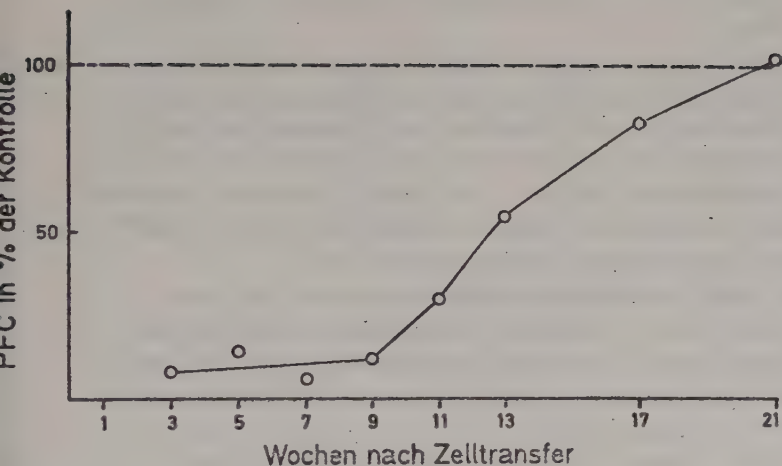


Abb. 1: Dauer der Hemmung durch Milzzellen von zweifach immunisierten Spendern nach Transfer auf syngene, unbehandelte Empfänger. Empfänger von 100×10^6 hyperimmunen Milzzellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfer mit 5×10^8 SRBC testimmunisiert. 4 Tage nach Testimmunisierung wurde die Immunantwort dieser Gruppe sowie die einer Gruppe, die keinen Zelltransfer erhalten hatte, im Plaquetest bestimmt. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der Gesamt PFC Werte (IgM und IgG) von jeweils 6 Tieren. Die PFC Antwort der Testtiere ist in % der Normalkontrolle (= 100 %) ausgedrückt.

Jeweils 3 Tage nach Transfer erfolgte die Testimmunisierung der Empfängertiere und unbehandelter Kontrolltiere und 4 Tage danach wurde die Immunantwort im Plaquettest untersucht (s. Schema 2).

Auch hier findet sich für zumindest 7 Wochen nach zweiter Immunisierung der Spender eine vollständige Hemmung der Empfängertiere nach Zelltransfer. Erst 23 Wochen nach der zweiten Immunisierung hat das Spendermaterial seine immunsuppressive Potenz verloren - d.h. wenn es zu diesem Zeitpunkt in einen syngenon Empfänger transferiert wird, kann es dessen Immunantwort nicht mehr negativ beeinflussen.

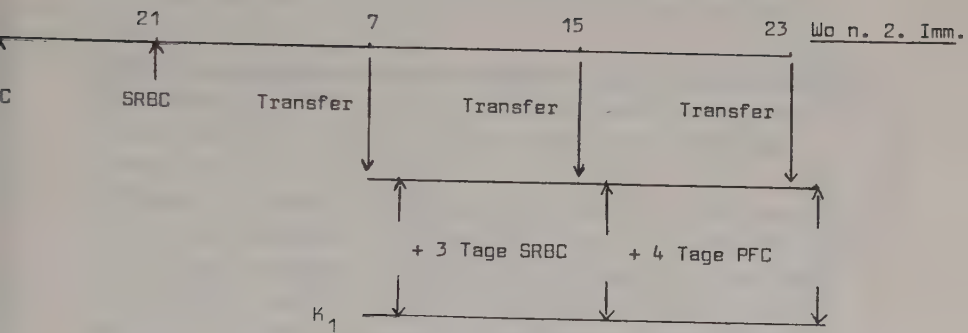
Diese beiden Versuchsergebnisse zeigen eine auffallende Parallelität in der Dauer der Hemmwirkung im Empfänger sowie im Spender. Daher lag zunächst die Vermutung nahe, daß das Aufhören der Hemmung mit einem Verlust an SRBC spezifischen Gedächtniszellen einhergeht. Diese Frage sollte mit Hilfe der beiden nächsten Versuchsansätze beantwortet werden.

1.6. Nachweis antigenspezifischer Gedächtniszellen im Spender 23 Wochen nach Zeitimmunisierung:

Für die Spendertiere war dieser Nachweis persistierender Gedächtniszellen einfach zu erbringen, indem man sie 23 Wochen nach der letzten Immunisierung ein drittes Mal immunisierte. Für den Fall, daß keine antigenspezifischen Gedächtniszellen mehr vorhanden wären, sollte man nach Immunisierung eine Primärantwort erhalten. Das Resultat war dagegen eine eindeutige Sekundärantwort mit einer Anteiligkeit von 95 % IgG PFC.

1.7. Nachweis antigenspezifischer Gedächtniszellen im Empfänger 21 Wochen nach Transfer:

Für die Empfängertiere war dieser Nachweis nicht so eindeutig zu erbringen, da es ja keine Unterscheidungsmöglichkeit für empfängereigene und vom Spender stammende Milzzellen gibt.



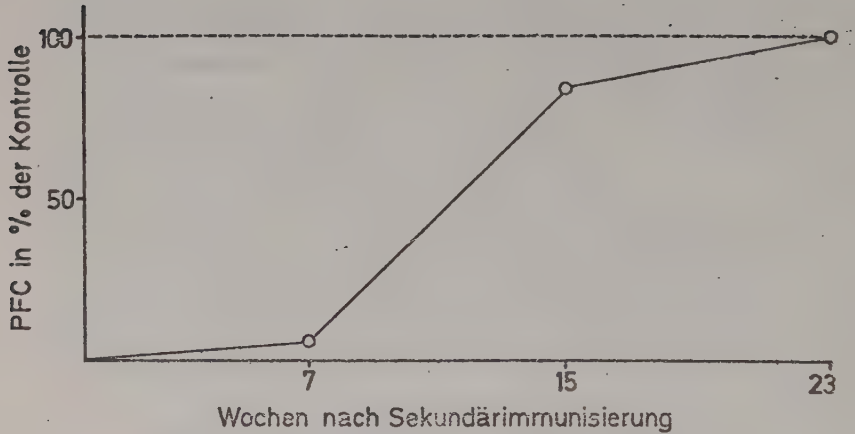


Abb. 2: Dauer der suppressiven Wirkung des Spendermaterials. Zu unterschiedlicher Zeitpunkten nach zweiter Immunisierung der Spendertiere wurden 100×10^6 Milzzellen auf syngene, unbehandelte Empfänger übertragen. 3 Tage nach Transfer wurden die Empfänger sowie unbehandelte Kontrolltiere mit 5×10^8 SRBC testimmunisiert und 4 Tage darauf wurde die Immunantwort beider Gruppen im Plaquetest untersucht. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der Gesamt PFC Werte (IgM und IgG) von jeweils 6 Tieren. Die PFC Antwort ist in % der Normalkontrolle (= 100 %) ausgedrückt.

Die Analyse der PFC Werte, die durch Immunisierung 21 Wochen nach Transfer erhalten wurden - zu einem Zeitpunkt also, zu dem die Gesamtzahl an PFC derjenigen normaler Kontrolltiere wieder entsprach - ließ jedoch zumindest die Vermutung zu, daß noch vom Spender stammende spezifische Zellen im Empfänger vorhanden waren.

Während nämlich eine normale Primärantwort nur etwa 10 % IgG Plaques 4 Tage nach Testimmunisierung aufweist, betrug der Prozentsatz an IgG PFC in den hier untersuchten Empfänger-tieren etwa 40 %.

Da sowohl im Spender 23 Wochen nach der zweiten Immunisierung als auch im Empfänger 21 Wochen nach Transfer antigenspezifische Gedächtniszellen nachweisbar waren, lag der Schluß nahe, daß nicht die Gegenwart dieser Zellen selbst, sondern vielmehr die ihrer Produkte, der spezifischen IgG Antikörper, verantwortlich für die Hemmung ist.

Die fehlende Hemmung hätte ihre Ursache in diesem Fall darin, daß sich zu diesem Zeitpunkt bereits alle spezifischen Zellen zu Gedächtniszellen differenziert hätten, die erst nach Antigenkontakt wieder Antikörper produzieren.

Falls diese Vermutung zuträfe, daß der Hemmeffekt abhängig ist von der Gegenwart zirkulierender spezifischer Antikörper, so müßte durch Reaktivierung der ruhenden Gedächtniszellen vor Testimmunisierung wieder eine Hemmung nachweisbar werden.

1.8. Reaktivierung der antigenspezifischen Gedächtniszellen im Spender:

Für die Spendertiere war dieses Problem wiederum einfach zu lösen - die Reaktivierung der ruhenden Gedächtniszellen 23 Wochen nach der letzten Immunisierung erfolgte durch eine dritte Immunisierung. Transferierte man dieses Zellmaterial, das wie bereits erwähnt wurde (1.6.) 95 % IgG PFC enthält, 3 Tage nach Immunisierung auf syngene, unbehandelte Empfänger, so reagierten diese 4 Tage später im Plaquetest mit einer stark supprimierten Immunantwort.

1.9. Reaktivierung der antigenspezifischen Gedächtniszellen im Empfänger:

Für die Reaktivierung der Hemmwirkung von Gedächtniszellen im Empfänger mußte man einen anderen Weg wählen. Eine weitere Immunisierung kam nicht in Frage, weil eine solche Behandlung 21 Wochen nach Transfer zu einer normalen ungehemmten Immunantwort führt (s. Abb. 1). Sofern die Hemmwirkung wirklich auf der Freisetzung von IgG aus reaktivierten Gedächtniszellen beruht, ist dieser Befund leicht zu erklären. Nach Befunden aus der Literatur (108, 135) sowie nach eigenen Ergebnissen (2.4.) wirken passiv verabreichte Antikörper nur suppressiv, wenn sie gleichzeitig mit oder zumindest kurz nach Antigen gegeben werden. Wird - wie im obigen Fall - die Antikörperproduktion erst durch das Antigen wieder provoziert, so kommen die aus den Spenderzellen stammenden IgG Antikörper zu spät, um die gleichzeitig angelaufene Antikörperproduktion des Empfängers zu hemmen. Das Resultat ist daher eine Immunantwort, die sich zusammensetzt aus Spenderplaques sowie aus weitgehend ungehemmten Empfängerplaques.

Wenn es dagegen gelänge, die Antikörperproduktion der spezifischen Gedächtniszellen durch einen unspezifischen Reiz, der selbst keine Immunisierung darstellte, anzuregen, so müßte nach der darauffolgenden Testimmunisierung die Hemmung wieder nachweisbar sein.

Dieser unspezifische Reiz wurde durch das B Zellmitogen LPS verursacht, das wie bereits erwähnt (A. 3.4.) eine polyklonale Antikörperbildung induziert.

Den Empfängern von Milzzellen zweifach immunisierter Spender wurden 13 Wochen und 23 Wochen nach Transfer jeweils 200 µg LPS verabreicht. 5 Tage später erfolgte die Testimmunisierung und 4 Tage danach der Plaquetest. In Abb. 3 ist die Immunantwort der beiden Empfängergruppen in % der Normalkontrolle aufgetragen. 13 Wochen nach Transfer entspricht die PFC Antwort der Empfänger 40 % der Normalkontrolle. Nach Vorbehandlung mit LPS

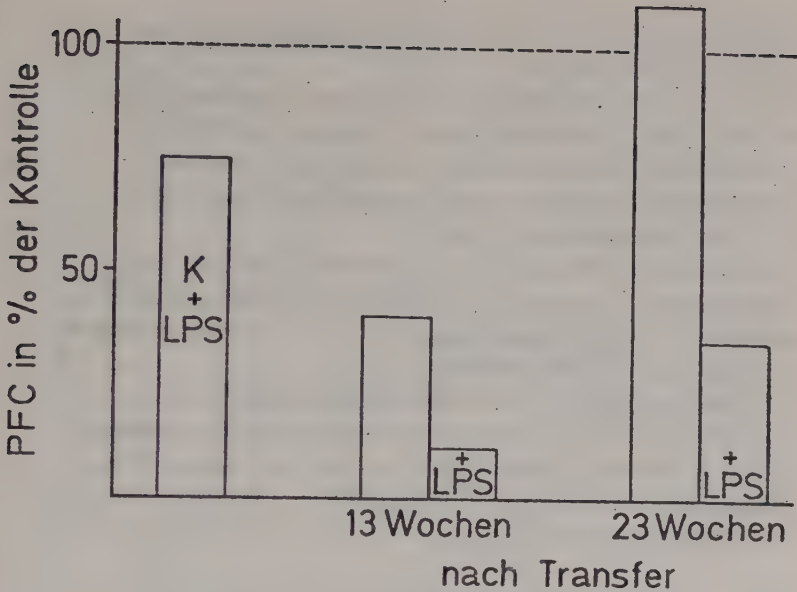


Abb. 3: Reaktivierung der antigenspezifischen Gedächtniszellen im Empfänger durch LPS.

Empfänger von hyperimmunen Milzzellen erhielten 13 bzw. 23 Wochen nach Transfer entweder nur Testimmunisierung mit SRBC oder 5 Tage vor Testimmunisierung 200 µg LPS. K + LPS repräsentiert eine Gruppe von Mäusen, die 200 µg LPS vor Testimmunisierung erhalten haben ohne vorherigen Transfer. Die PFC Antwort 4 Tage nach Testimmunisierung ist in % der Normalkontrolle (= 100 %) ausgedrückt. Die jeweils linken Balken geben die PFC Antwort der Testgruppen ohne LPS Vorbehandlung wieder, die jeweils rechten Balken geben die PFC Antwort nach LPS Vorbehandlung wieder.

reduziert sich die Antwort der gleichen Empfängergruppe auf 11 % der Kontrolle.

23 Wochen nach Transfer ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen wesentlich größer - während die nicht LPS vorbehandelte Gruppe wie die Normalkontrolle reagiert, ist die Immunantwort der LPS vorbehandelten Gruppe auf 35 % der Normalkontrolle reduziert.

Eine zusätzliche Kontrollgruppe bildeten Tiere, die LPS ohne vorherigen Zelltransfer 5 Tage vor Testimmunisierung erhielten. Die PFC Antwort dieser Tiere ist leicht gehemmt - sie beträgt 78 % der Kontrolle.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob die nach Vorbehandlung mit LPS beobachtete geringfügige Hemmung auf einen direkten Einfluß von LPS, oder ebenfalls auf die Freisetzung von Antikörpern zurückzuführen ist, deren Bildung es selbst induzierte.

1.9.1 LPS induzierte Antikörperbildung gegen SRBC:

Die Annahme, daß LPS tatsächlich aufgrund der Produktion von Antikörpern suppressiv wirkt, wurde durch die folgenden Versuche weiter gestützt.

Eine Gruppe von nichtimmunisierten Tieren wurde mit 200 µg LPS behandelt, und 1 bis 7 Tage später wurde ihre PFC Antwort gegen SRBC bestimmt.

Abb. 4 zeigt, daß LPS trotz seines unspezifischen Effektes auf B Zellen eine SRBC spezifische Antwort induzieren kann. Die Kinetik dieser Antikörperproduktion stimmt dabei qualitativ weitgehend mit der durch das spezifische Antigen induzierten Kinetik überein (Maximum der IgM Produktion an Tag 4, Maximum der IgG Produktion an Tag 6), die Antwort ist nur quantitativ gesehen sehr viel geringer. Der Grund hierfür liegt sicher darin, daß LPS eine große Anzahl von B Zellen mit vielen verschiedenen Spezifitäten zur Produktion anregt (siehe auch die erhöhte Antwort gegen Kaninchenerythrozyten an Tag 4), statt

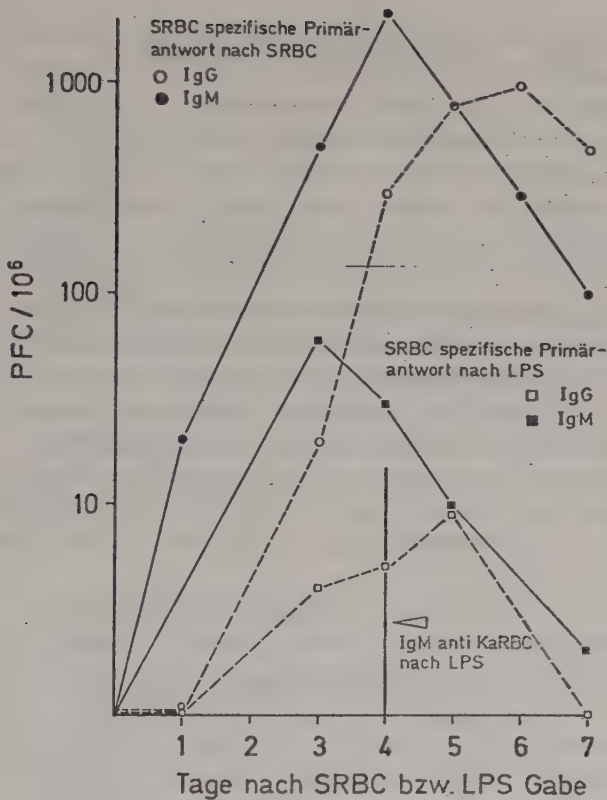


Abb. 4: LPS induzierte Antikörperbildung gegen SRBC

Jeweils 6 Tiere pro Gruppe erhielten am Tag 0 entweder 5×10^8 SRBC oder 200 μ g LPS. Zu verschiedenen Zeitpunkten danach wurde die PFC Antwort - sowohl IgM als auch IgG PFC - gegenüber SRBC bestimmt. Die LPS behandelte Gruppe wurde zusätzlich 4 Tage nach LPS Gabe im Plaquetest auf ihre Immunantwort gegen KaRBC untersucht.

selektiv wie das spezifische Antigen einen Klon zur Proliferation und Expansion zu stimulieren.

Die Aktivierung durch LPS führt außerdem nicht zur Ausbildung von immunologischen Gedächtnis gegenüber SRBC.

Dies zeigt der folgende Versuch: Einer Gruppe von Tieren wurden 200 µg LPS verabreicht. 16 Tage danach wurden diese Tiere mit SRBC immunisiert und 4 Tage später die Immunantwort im Plaque-test untersucht. Das Resultat entsprach eindeutig der entsprechenden Primärkontrolle (Tab. 6). Hätte LPS wie ein spezifisches Antigen zur Ausbildung von Gedächtnis gegen SRBC geführt, so wäre eine Sekundärantwort zu erwarten gewesen. Daß dagegen LPS in der Lage ist, bereits vorliegende Gedächtniszellen zu aktivieren, zeigen die in Tab. 7 wiedergegebenen Daten. Tiere erhielten an Tag 0 SRBC, 14 Tage später erhielt ein Teil erneut SRBC, ein anderer LPS, eine dritte Gruppe blieb zu diesem Zeitpunkt unbehandelt. An Tag 19 wurden die PFC Werte ermittelt.

Während Tiere, die 19 Tage vor Plaque-test einmal immunisiert wurden, 50 IgG PFC/ 10^6 Zellen bildeten, führte LPS-Gabe 5 Tage vor Plaque-test zu einer Steigerung auf 140 IgG PFC/ 10^6 Milzzellen.

Dies läßt darauf schließen, daß LPS in der Lage ist, SRBC spezifische Gedächtniszellen abzurufen. Daß das spezifische Antigen hierzu sehr viel besser in der Lage ist (2200 IgG PFC/ 10^6 Zellen) mag daran liegen, daß dieses nur den spezifischen Zellklon anspricht im Gegensatz zu der polyklonalen Aktivierung durch LPS.

Insgesamt kann aufgrund der wiedergegebenen Befunde gesagt werden, daß LPS in vivo auch ohne vorherige Immunisierung SRBC spezifische Plaques induziert und zwar sowohl vom IgM als auch vom IgG Typ. Es ist zusätzlich in der Lage, Gedächtniszellen abzurufen, so daß im Hinblick auf die oben angeführten Transferuntersuchungen von immunisiertem Milzzellmaterial die Reaktivierung der Hemmwirkung im Empfänger durch

	IgM PFC/ 10^6	IgG PFC/ 10^6	% IgG
Kontrolle	2700	1200	31
LPS			
16 Tage vor	2000	1300	39
SRBC			

Tab. 6: Einfluß von LPS auf die Immunantwort gegen SRBC in vivo. Eine Gruppe von 6 Mäusen erhielt eine Dosis von 200 µg LPS. 16 Tage später wurden diese Tiere sowie eine unbehandelte Kontrollgruppe mit 5×10^8 SRBC immunisiert. 4 Tage darauf wurde die PFC Reaktivität beider Gruppen bestimmt.

	IgM PFC/ 10^6	IgG PFC/ 10^6
I Tag 0:SRBC	4	50
II Tag 0:SRBC	80	140
Tag 14:LPS		
III Tag 0:SRBC	30	2200
Tag 14:SRBC		

Tab. 7: Aktivierung von SRBC spezifischen Gedächtniszellen durch LPS in vivo.

Am Tag 0 wurden 3 Gruppen von je 6 Tieren mit 5×10^8 SRBC immunisiert. 14 Tage später erhielt Gruppe III erneut 5×10^8 SRBC, Gruppe II erhielt 200 µg LPS und Gruppe I blieb zu diesem Zeitpunkt unbehandelt. 5 Tage später wurde die PFC Reaktivität der 3 Gruppen bestimmt.

LPS auf eine Reaktivierung der Gedächtniszellen zur IgG Synthese zurückgeführt werden kann.

1.10. Nachweis der Antispezispezifität für die reaktivierte Hemmung im Empfänger:

Wenn man annimmt, daß die durch LPS induzierte Hemmung der Immunantwort von Empfängertieren 21 Wochen nach Transfer auf der Reaktivierung von Antikörperproduktion beruht - man sich andererseits aber vor Augen hält, daß LPS eine polyklonale Antikörperproduktion hervorruft - so könnte man vermuten, daß durch LPS Vorbehandlung auch die Reaktionsfähigkeit gegen andere Antigene beeinträchtigt ist.

Um dies zu testen, wurden Tiere, denen in diesem Fall vor 18 Wochen Milzzellen zweifach immunisierter Spender übertragen worden waren, wiederum mit 200 µg LPS behandelt. Anstelle von SRBC erhielten sie jedoch 5 Tage später Kaninchenerythrozyten (KaRBC) und 4 Tage danach wurde die Immunantwort im Vergleich zu einer normalen Primärkontrolle gegen SRBC und KaRBC bestimmt.

Tab. 8 zeigt, daß die Reaktivität der Empfänger von SRBC immuner Milz gegenüber KaRBC auch durch LPS Vorbehandlung nicht negativ beeinflusst wurde, während die Reaktivität gegenüber SRBC wieder deutlich vermindert wurde.

Somit ist erwiesen, daß LPS durch unspezifische Wirkung einen antispezifischen Effekt induzieren kann. Der Hemmeffekt ist dabei abhängig vom Vorhandensein spezifischer, potentiell IgG bildender Zellen.

2. Hemmung der humoralen Immunantwort durch Antikörper in vivo.

In den bisher durchgeführten Versuchen wurde gezeigt, daß man durch spezifische IgG produzierende B Zellen eine langanhaltende Suppression der humoralen Immunantwort gegen das spezifische Antigen erhalten kann. Diese beruht auf der Freisetzung

	IgM PFC/ 10^6	
	SRBC	KaRBC
Kontrolle	900	400
Transfer- gruppe	300	450
Transfer- gruppe + LPS	90	400

Tab. 8: Nachweis der Antigenspezifität für die LPS induzierte Reaktivierung der Hemmwirkung übertragener Immunzellen in vivo.

Tiere, die 18 Wochen zuvor 100×10^6 hyperimmune Milzzellen erhalten hatten, wurden entweder mit 5×10^8 SRBC oder 5×10^8 KaRBC immunisiert ("Transfergruppe"). "Transfergruppe + LPS" repräsentiert eine Gruppe von Tieren, die entsprechend der obigen Testgruppe 18 Wochen zuvor hyperimmune Milzzellen erhalten hatte, zusätzlich aber noch 200 μ g LPS 5 Tage vor Testimmunisierung mit entweder SRBC oder KaRBC. Die IgM PFC Antwort der beiden Testgruppen wird mit der IgM PFC Antwort einer normalen Primärkontrolle 4 Tage nach Immunisierung verglichen.

antigenspezifischer IgG Antikörper aus übertragenen Spender-B Zellen ("B suppressor Zellen", 128). Somit scheint die B zellvermittelte Suppression in ihrem Mechanismus der in der Literatur beschriebenen Suppression durch passiv zugeführte Antikörper zu entsprechen.

Die weiteren Untersuchungen der hier vorgelegten Arbeit hatten zum Ziel, den Mechanismus der durch Antikörper vermittelten Hemmung der humoralen Immunantwort näher zu charakterisieren. Hierfür wurden zunächst Hyperimmunseren passiv appliziert, in den späteren Versuchen wurden gereinigte IgG Fraktionen spezifischer Antiseren verwendet.

2.1. Vergleich der Hemmwirkung von homologem und heterologem Antiserum in vivo:

Gruppen von Mäusen erhielten 0.2 ml eines homologen bzw. eines heterologen (Kaninchen) anti SRBC Serums, die hinsichtlich ihres Agglutinationstiters einander angepaßt worden waren. 1 Stunde später erhielten die Tiere 5×10^8 SRBC.

Im Plaquetest 4 Tage nach Immunisierung erwies sich die Hemmwirkung beider Antiseren als gleich stark (Resultate nicht gezeigt, s. aber 3.3.).

Für die weiteren Versuche zur Analyse des Hemmechanismus wurden jeweils 0.2 ml des heterologen Hyperimmunserums in einer Verdünnung injiziert, die einem Titer von 10^9 entsprach.

2.2 Antigenspezifität der Hemmung durch passiv zugeführten Antikörper:

Auch die durch passiv zugeführten Antikörper bewirkte Hemmung ist antigenspezifisch (Tab. 9).

Während die Reaktion gegen SRBC durch Gabe von anti SRBC Serum völlig unterdrückt ist, erfolgt eine normale Antwort gegen KaRBC.

	19 S PFC/10 ⁶	
	SRBC	KaRBC
Kontrolle	1700	300
Testgruppe	8	300

Tab. 9: Antigenspezifität der Hemmung durch passiv
zugeführten Antikörper in vivo

2.3. Dauer der antikörpervermittelten Hemmung:

Abb. 5 zeigt die Dauer der durch passiv übertragenen Antikörper bewirkten Suppression im Vergleich zur Dauer der Suppression nach Transfer IgG bildender B Zellen.

Eine Gruppe von Tieren erhielt eine optimale Dosis anti-SRBC Serum (Titer 1n 9). 1 bis 9 Wochen später erfolgte Testimmunisierung mit SRBC.

Die Immunantwort der Empfänger war 3 Wochen lang stark supprimiert, erreichte aber bereits 9 Wochen nach Gabe des Antiserums wieder Normalwerte, während die Empfänger hyperimmuner Milzzellen zu diesem Zeitpunkt erst 12 % der normalen Immunantwort erreicht haben.

Dieser große Unterschied in der Dauer der Hemmwirkung dürfte auf die wesentlich geringere Halbwertszeit von Antikörpern im Vergleich zu der Überlebensrate der übertragenen IgG bildenden Zellen zurückzuführen sein.

2.4. Zeitkinetik der Antikörperhemmung:

Wie bereits erwähnt wurde, können spezifische Antikörper nur dann suppressiv wirken, wenn sie in einem bestimmten Zeitverhältnis zum Antigen verabreicht werden.

Tab. 10 zeigt den Einfluß einer optimalen Dosis Antiserum 1 Stunde vor bzw. 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Antigen auf die PFC Antwort der Empfänger.

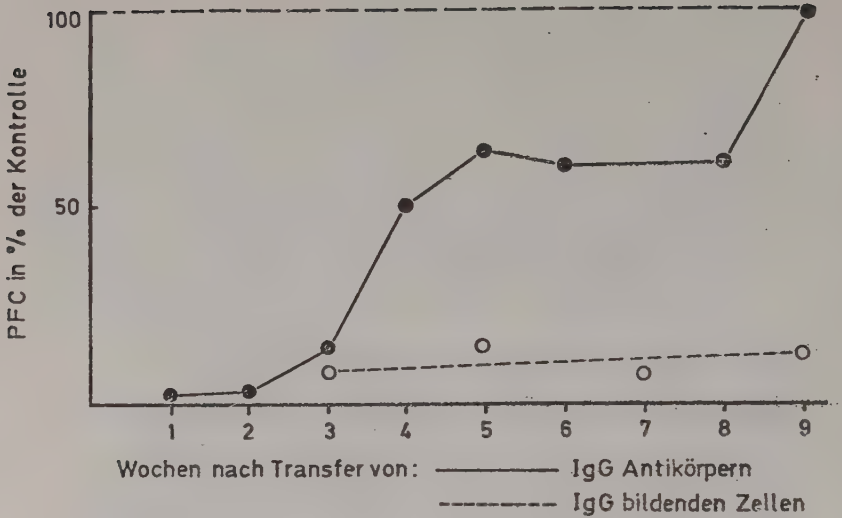


Abb. 5: Dauer der antikörpervermittelten Hemmung

Eine Anzahl von Tieren erhielt 0.2 ml anti SRBC (Titer 1n 10). 1 bis 9 Wochen später wurden jeweils 6 Tiere aus der mit Antiserum behandelten Gruppe sowie unbehandelte Kontrolltiere mit 5×10^8 SRBC testimmunisiert, 4 Tage darauf wurde die PFC Antwort ermittelt. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der Gesamt PFC Werte (IgM und IgG) von jeweils 6 Tieren, die PFC Reaktivität ist in % der Normalkontrolle (= 100 %) aufgetragen. Zum Vergleich sind zusätzlich die PFC Werte 4 Tage nach Testimmunisierung von Empfängern hyperimmuner Milzzellen 1 bis 9 Wochen nach Transfer nochmals aufgetragen (gestrichelte Kurve, s. Abb. 1).

Während die Immunantwort von Tieren, die das Antiserum gleichzeitig mit Antigen erhalten haben, völlig supprimiert ist, steigt sie bereits nach einer 6-stündigen Verzögerung der Antiserumgabe um mehr als das 30-fache an.

Eine Antiserumgabe 48 Stunden nach Antigen bewirkt im Vergleich zur unbehandelten Normalkontrolle zwar immer noch eine Suppression, jedoch ist die Immunantwort im Vergleich zu der Gruppe, die Antiserum zusammen mit Antigen erhalten hat, um das 150-fache erhöht.

	19S PFC/10 ⁶	7S PFC/10 ⁶
Kontrolle	7500	2500
Antiserum + 0 h	24	8
Antiserum + 6 h	700	300
Antiserum + 12 h	400	100
Antiserum + 24 h	600	200
Antiserum + 48 h	3900	1100

Tab. 10: Zeitkinetik der Antikörperhemmung in vivo.

2.5. Bedeutung des Antikörper Fc Fragmentes für die Hemmung:

Da in der Literatur die Wichtigkeit des Fc Fragmentes für die antikörpervermittelte Hemmung nicht einheitlich beurteilt wird (45, 22), wurde die Hemmfähigkeit von intaktem Antikörper gegenüber $F(ab)_2$ Fragmenten, die kein Fc Stück besitzen, nochmals überprüft.

Dafür wurden Tieren intaktes anti-SRBC Serum vom Kaninchen bzw. $F(ab)_2$ Fragmente dieses Antiserums in vergleichbarer Titerhöhe injiziert. Abb. 6 zeigt deutlich, daß die $F(ab)_2$ Antikörperfragmente keinen negativen Einfluß auf die Immunantwort der Empfänger haben, während intakter Antikörper die Immunantwort der Empfänger auf 8 % der Kontrolle verringert.

Da dieser Befund die Annahme stützt, daß der Fc Anteil des Immunglobulins für den Hemmeffekt notwendig ist, wurde zur weiteren Bestätigung der Versuch unternommen, die $F(ab)_2$ Fragmente künstlich mit einem Fc Stück zu substituieren, und zwar durch Zugabe eines anti Kaninchen γ Globulinserums von der Ziege. Abb. 6 zeigt, daß die Zugabe dieses Serums zu den $F(ab)_2$ Fragmenten wieder eine leichte Reduktion der Immunantwort bewirkte (auf 56 % der Kontrolle).

Dieses Ergebnis ließ sich in den folgenden Versuchen nicht konstant reproduzieren oder gar verbessern.

Dies muß vermutlich darauf zurückgeführt werden, daß Antikörperfragmente in vivo sehr schnell katabolisiert oder ausgeschieden werden (126), so daß die gewünschte Interaktion des anti-Kaninchen γ Globulinserums mit den $F(ab)_2$ Fragmenten in vivo nur in geringem Ausmaß möglich sein dürfte.

Alle folgenden Versuche zur Aufklärung des Hemmechanismus der antikörpervermittelten Hemmung wurden daher in vitro durchgeführt.

Mit Hilfe von Dr. Erb (Basel) wurden dafür zunächst zwei modifizierte Kultursysteme etabliert - ein Marbrook System und ein Mishell Dutton System (s. Methoden).

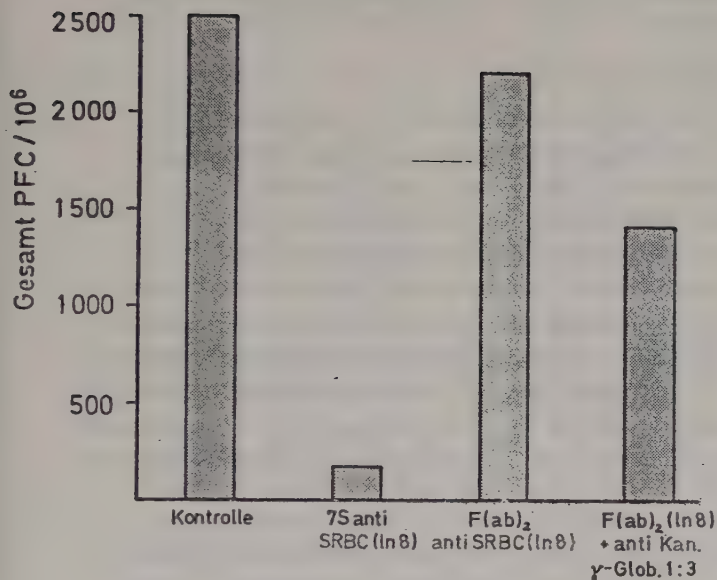


Abb. 6: Rekonstitution des Fc Fragmentes in vivo.

Gruppen von jeweils 6 Tieren erhielten entweder nur 5×10^8 SRBC (Kontrolle) oder 1 Stunde vor SRBC 0.2 ml anti SRBC Serum (Titer 1n8) bzw. 0.2 ml F(ab)₂ anti SRBC (Titer 1n8) bzw. 0.2 ml F(ab)₂ anti SRBC + 0.2 ml anti Kaninchen γ Globulinserum (1:3 verdünnt). 4 Tage später wurde die Immunantwort der 4 Gruppen im Plaquestest ermittelt. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der Gesamt PFC (IgM und IgG).

3. Hemmung der humoralen Immunantwort durch Antikörper
in vitro:

3.1. Grundversuche in vitro:

Alle Versuchsergebnisse erwiesen sich als unabhängig von der Wahl des Kultursystems, so daß die beiden Systeme beliebig miteinander ausgetauscht werden konnten.

Während das Marbrook System den Vorteil bietet, höhere Plaquewerte zu erzielen, wodurch auch kleinere Abweichungen von der Normalkontrolle im Unterschied zu background Werten besser erkennbar sind, bietet das modifizierte Mishell Dutton System den Vorteil, daß man mit einer wesentlich geringeren Zellzahl (1×10^6 statt 15×10^6) und kleineren Mengen an Testsubstanzen arbeiten kann.

Die background Werte (d.h. anti SRBC PFC in Kulturen ohne Antigen) lagen für beide Systeme zwischen 10 und 20 % der Normalkontrolle. Dagegen lag die Zahl überlebender Zellen nach 4 tägiger Kulturperiode für das Mishell Dutton System im allgemeinen höher (ca. 40 %) als für das Marbrook System (ca. 20 %).

In allen in vitro Versuchen wurden nur IgM PFC bestimmt, da IgG PFC nur nachweisbar waren, wenn die Zellen in vivo vor-sensibilisiert waren.

3.2. Versuche zur Hemmwirkung von Zellen immunisierter
Tiere auf Normalzellen in vitro:

In den ersten Experimenten in vitro wurde versucht, die in vivo nachgewiesene Hemmung nach Transfer von Milzzellen immunisierter Spender auf normale Empfänger zu reproduzieren. Zunächst wurden Zellen von einmal mit SRBC immunisierten Tieren zu Kulturen mit Normalzellen syngener Tiere zugemischt. Wie nach den Resultaten von Witzgenhausen erwartet (Tab. 1) ergab sich dadurch keine Reduktion der PFC Werte (Tab. 11.)

	Normal- zellen	Immun- zellen	Normalz. + 50 % Immunez.
IgM PFC/10 ⁶	1375	2500	2500

Tab. 11: Einfluß von Milzzellen einfach immunisierter
Tiere auf Normalzellen in vitro.

Im nächsten Experiment wurden dann Zellen von zweimal SRBC immunisierten Tieren zugemischt, aus denen zusätzlich noch T Zellen und Makrophagen entfernt worden waren. Überraschenderweise bewirkte auch die Zumischung hyper-immuner Zellen keine Suppression der PFC Werte (Tab. 12).

	Normal- zellen	Normalz. + 50 % 2x Immunez.	Normalz. + 50 % 2x Immunez. anti θ , adhäriert
IgM PFC/10 ⁶	1825	2935	2730

Tab. 12: Einfluß von Milzzellen zweifach immunisierter Tiere
auf Normalzellen in vitro.

Aus diesen Daten ist zunächst nicht zu entnehmen, aus welcher der beiden Zellpopulationen die nachgewiesenen PFC stammen. Da jedoch in dem Testansatz nur IgM Plaques nachgewiesen werden und diese in hyperimmunen Milzzellsuspensionen in vermindertem Anteil vorliegen, dürfte es sich bei den nachgewiesenen PFC um solche der Normalzellpopulation handeln.

Diese Annahme erscheint auch dadurch gerechtfertigt, daß eine Verringerung der Anzahl zugemischter Immunzellen keine Änderung des Ergebnisses brachte (Resultat nicht gezeigt).

Ein weiteres unerwartetes Ergebnis brachte der folgende Versuchsansatz, in dem Zellen von Empfängern hyperimmuner Milzzellen in vitro getestet wurden. Während die Empfänger-tiere selbst eine stark supprimierte Immunantwort gegen SRBC zeigten, reagierten ihre Zellen in vitro mit erhöhten PFC Werten.

Eine Zumischung solcher Zellen zu Normalzellen ergab ebenfalls eine Stimulation der PFC Antwort. Auch die Annahme, daß der Grund für die fehlende Hemmung in einer verzögerten Freisetzung von spezifischen Antikörpern aus den zugemischten Zellen zu suchen sei, ließ sich nicht bestätigen, denn eine 24-stündige Vorinkubation von Normalzellen mit Immunzellen (Resultat nicht gezeigt) bzw. Zellen 'toleranter' Empfänger ohne Antigen führte ebenfalls nicht zu einer Hemmung: Tab. 13.

	Normal- zellen	"Toler." ⁽¹⁾ Zellen	Normalz. + 33% Tol. Z. ⁽²⁾	Normalz. + 17 % Tol. Z. ⁽²⁾
IgM PFC/10 ⁶	180	247	630	630

Tab. 13: Einfluß von Milzzellen "toleranter" Tiere auf Normalzellen in vitro

- 1) 'Tolerante' Zellen bedeutet: Zellen von Empfängern 2 x immuner Milzzellen, 1 Woche nach Transfer
- 2) 'Tolerante' Zellen wurden 24 Stunden ohne Antigen mit Normalzellen vorinkubiert.

Weitere Versuche, auch in vitro die hemmende Wirkung von immunen Zellen nachzuweisen wurden nicht durchgeführt. Eine Bestätigung der in vivo Ergebnisse (Hemmung normaler Empfänger durch Transfer hyperimmuner Zellen) ist mit den hier verwendeten Kultursystemen offensichtlich nicht möglich. Es kann derzeit nicht gesagt werden, aus welchen Gründen die Hemmwirkung immunisierter B Zellen in vitro nicht wirksam wird - dies könnte unter anderem auf der ungünstigeren Relation dieser Zellen zum Kulturvolumen beruhen. Da jedoch aufgrund der dargelegten Versuche in vivo die Hemmwirkung der immunen B Zellen auf die von ihnen freigesetzten Immunglobuline zurückgeführt werden konnte, wurde bei den weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung des Hemmechanismus in vitro ausschließlich mit gereinigtem IgG anti SRBC Antiserum gearbeitet.

3.3. Vergleich der Hemmwirkung von homologem und heterologem Antiserum in vitro:

Aus der Literatur ist bekannt, daß eine humorale Immunantwort sowohl durch homologes als auch durch heterologes spezifisches Antiserum gehemmt werden kann (134). Dies konnte auch in eigenen Vorversuchen in vivo bestätigt werden.

Im folgenden sollte nachgeprüft werden, ob auch in vitro beide Antiseren eine gleichartige Hemmwirkung besitzen.

Dafür werden (in jeweils vergleichbarer Titerverdünnung) ein homologes IgG anti SRBC Serum sowie ein Kaninchen anti SRBC IgG Serum gleichzeitig mit Antigen der Kultur zugesetzt und der Einfluß der beiden Antiseren auf die PFC Bildung bestimmt.

Wie Abb. 7 zeigt, führt die Zugabe von beiden Antiseren zu einer ausgeprägten Hemmung der Antikörperbildung; die Dosiswirkungskurven für beide Antiseren verlaufen parallel zueinander - sie besitzen demnach die gleiche Hemmpotenz.

$F(ab)_2$ Fragmente des heterologen Antiserums wirken in geringer Verdünnung ebenfalls hemmend, was man wahrscheinlich auf eine Beteiligung peripherer Hemmphenomene (Abdeckung antigener Determinanten), die in vitro stärker zur Geltung kommen als in vivo, zurückführen kann.

Eine allgemeine Schwierigkeit bei in vitro Versuchen besteht darin, daß jedes Serum - d.h. also auch homologes und heterologes Serum von nichtimmunisierten Tieren - wenn es unverdünnt in die Kultur gegeben wird, einen unspezifischen Hemmeffekt ausübt. In allen folgenden Versuchen wurde daher das anti SRBC Serum in einer Verdünnung eingesetzt, die einem Titer von $1:7$ entsprach, so daß unspezifische Nebeneffekte weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

3.4. Zeitkinetik der Antikörperhemmung in vitro:

IgG anti SRBC Serum wurde gleichzeitig, bzw. 2, 6, 24, 30 und 52 Stunden nach Antigen der Kultur zugesetzt.

Abb. 8 zeigt, daß die PFC Werte bis zu einer 6-stündigen Verzögerung der Antiserumgabe noch im Bereich des backgrounds liegen und dann erst langsam ansteigen bis auf 80 % der Normalkontrolle bei 52 stündiger Verzögerung. In allen späteren Versuchen wurde das Antiserum immer zum gleichen Zeitpunkt wie Antigen der Kultur zugegeben.

3.5. Rekonstitution des Fc Stückes in vitro:

Wie die in Abb. 7 wiedergegebenen Untersuchungen in vitro und die in Abb. 6 beschriebenen Untersuchungen in vivo gezeigt haben, ist die durch Antikörper vermittelte Hemmung der Immunreaktion von einem intakten Fc Stück des Immunglobulins abhängig. Es sollte daher (in Parallele zu den weitgehend vergeblichen Versuchen in vivo) unter den standardisierten Kulturverhältnissen nochmals versucht werden, den dem $F(ab)_2$ Fragment fehlenden Fc Anteil zu rekonstituieren.

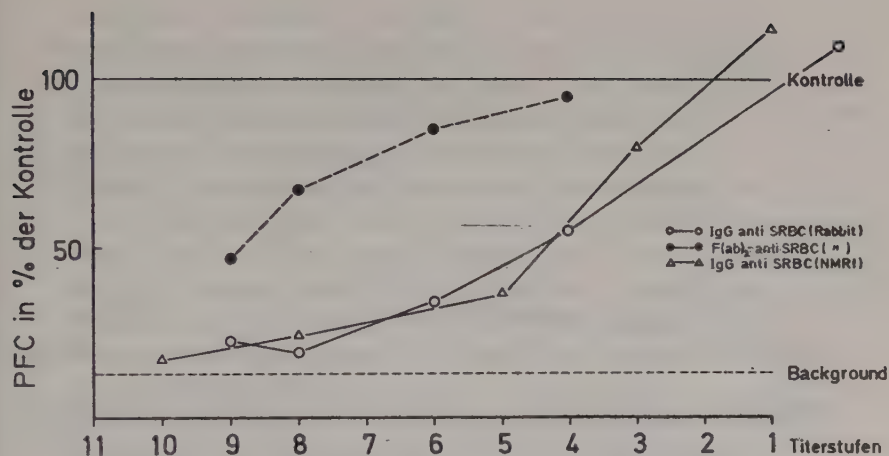


Abb. 7

Vergleich der Hemmwirkung von homologem und heterologem anti-SRBC IgG sowie F(ab)₂ anti SRBC Fragmenten in vitro. Die Ausgangstiterstufe für das homologe Antiserum betrug 1n 10, für das heterologe Antiserum sowie F(ab)₂ Fragmente 1n 9. Eine Reduktion der Titerwerte um eine Stufe bedeutet jeweils eine Verdünnung des Serums um den Faktor 2.

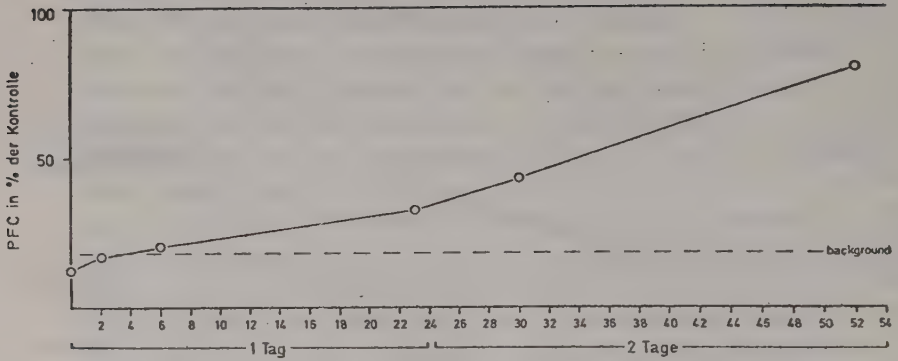


Abb. 8: Zeitkinetik der Antikörperhemmung in vitro.
Anti SRBC IgG (Titer 1n 7) wurde gleichzeitig mit, bzw. 2, 6, 24, 30 und 52 Stunden nach Antigen Milzzellkulturen zugegeben. 4 Tage später wurde die PFC Antwort bestimmt und in % der Normalkontrolle (= 100%) aufgetragen.

Dafür wurde zunächst ein Antiserum gegen $F(ab)_2$ anti SRBC Fragmente hergestellt, indem Meerschweinchen mit $F(ab)_2$ Fragmenten mehrmals immunisiert wurden. Anschließend wurde die IgG Fraktion dieses Hyperimmunserums isoliert.

Es zeigte sich allerdings, daß die Zugabe dieses Serums alleine zu Kulturansätzen bereits eine starke Hemmung der PFC Antwort bewirkte, die auch in hoher Verdünnung des Serums noch nachweisbar war. Aufgrund dieses unspezifischen Hemmeffektes konnte die Rekonstitution des Fc Anteils am $F(ab)_2$ Fragment, von der eine Wiederherstellung der spezifischen Hemmwirkung erwartet wurde, nicht mit diesem anti $F(ab)_2$ Serum getestet werden.

Warum dieses Antiserum im Unterschied zu anderen Meerschweinchenseren einen Hemmeffekt in vitro besaß, blieb ungeklärt. Vermutungen, daß es sich dabei um ein anti-Rezeptorserum handeln könne, das vielleicht gegen die variable Region des $F(ab)_2$ Fragmentes gerichtet sein könnte statt gegen den Restanteil der konstanten Region der schweren Ketten wie eigentlich beabsichtigt war, ließen sich experimentell nicht bestätigen. Im folgenden Versuchsansatz wurde für die Rekonstitution des Fc Stücks daher wieder anti Kaninchen γ Globulinserum verwendet wie in den in vivo Versuchen (Abb. 6).

Zunächst wurde ermittelt, in welchen Relationen $F(ab)_2$ Fragmente und anti Kaninchen γ Globulin optimal miteinander reagieren. Dazu wurden in einer Ouchterlony Immundiffusion $F(ab)_2$ Fragmente in einer Standardverdünnung, die einem Titer von $\ln 4$ entsprach, gegen unterschiedliche Verdünnungen anti Kaninchen γ Globulin getestet und das optimale Reaktionsverhältnis ermittelt, das bei einer Verdünnung des anti Kaninchen γ Globulinserums von 1:128 lag. $F(ab)_2$ Fragmente (Titer $\ln 4$) und anti Kaninchen γ Globulin (1:128) verdünnt) wurden daraufhin in gleichen Volumenverhältnissen für 24 Stunden bei 4°C vorinkubiert und dann Kulturen zugesetzt. Abb. 9 zeigt die PFC Werte nach Zugabe von intaktem IgG anti SRBC Serum und $F(ab)_2$ Fragmenten (beide in einer Verdünnung,

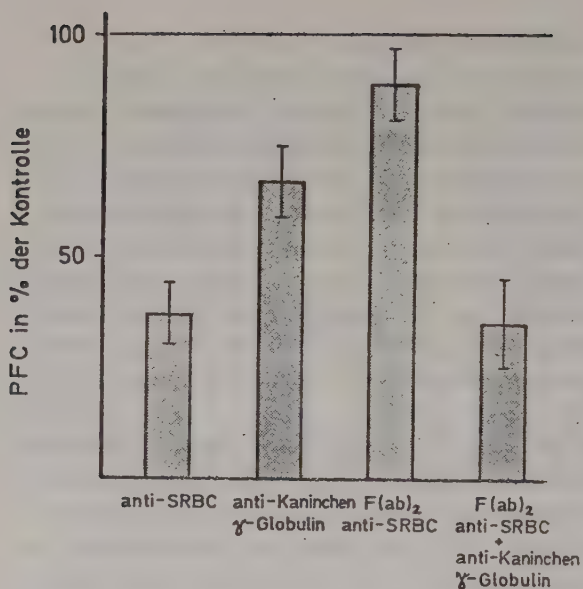


Abb. 9: Rekonstitution des Fc Fragmentes in vitro

Zu Milzzellkulturen wurden jeweils gleiche Volumina anti SRBC IgG (Titer 1n 4) bzw. $F(ab)_2$ Fragmente (Titer 1n 4) bzw. anti Kaninchen γ Globulinserum (1:128 verdünnt) bzw. Komplexe aus $F(ab)_2$ Fragmenten und anti Kaninchen γ Globulin zugesetzt. 4 Tage später wurde die PFC Antwort ermittelt.

die einem Titer von 10^4 entsprach), sowie anti Kaninchen γ Globulin einzeln und im Komplex mit $F(ab)_2$ Fragmenten. Während $F(ab)_2$ Fragmente und anti Kaninchen γ Globulin für sich alleine nur eine geringe Hemmwirkung besaßen, wurde durch Zugabe der Komplexe aus beiden Seren wieder eine Hemmung erreicht, die der des intakten Antikörpers entsprach. Dieser Versuch stellt einen weiteren Beweis für die Notwendigkeit des Fc Fragmentes bei der antikörpervermittelten Hemmung dar. Außerdem wird aber hierdurch deutlich, daß der Fc Anteil des Antikörpers zwar notwendig ist für eine spezifische Ausschaltung der Immunantwort, daß er aber auch durch einen an das $F(ab)_2$ Fragment gebundenen Antikörper ersetzt werden kann, der hinsichtlich seiner Antigenspezifität keinerlei Gemeinsamkeit mit der des rekonstituierten $F(ab)_2$ Fragmentes hat.

3.6. Bestimmung des Reaktionspartners für das Fc Stück des Antikörpers:

Obwohl die Bedeutung des Fc Fragmentes auf dem Antikörpermolekül bei der Ausschaltung der Immunantwort schon früher postuliert worden war (22), blieb der Reaktionspartner auf zellulärer Ebene für das Fc Fragment des Immunglobulins zunächst unbekannt. Es lag jedoch nahe, ihn in dem Fc Rezeptor zu vermuten, der auf B Zellen, einigen T Zellsubpopulationen und Makrophagen vorhanden ist. Eine Beteiligung dieses Rezeptors an der Immunregulation wurde schon 1975 von Dickler et al. (31) postuliert, da diese Autoren eine Assoziation von Fc Rezeptoren mit Ia Antigenen beobachteten, die von der immune response Genregion im H-2 Komplex codiert werden. Durch anti Ia Antiseren konnten Fc rezeptorabhängige Funktionen wie z.B. die Rosettenbildung mit IgG sensibilisierten Erythrozyten inhibiert werden.

Obwohl auch von Ryan und Henkart (112) eine Beteiligung von Fc Rezeptoren in der antikörpervermittelten Hemmung der humoralen Immunantwort nahegelegt wurde, stand ein direkter experimenteller Beweis dafür noch aus.

Dieser Beweis konnte im Rahmen der vorgelegten Untersuchungen erbracht werden und zwar durch den folgenden Versuchsansatz: Milzzellen wurden mit IgG sensibilisierten Erythrozyten inkubiert, die mit Fc rezeptortragenden Lymphozyten Rosetten bildeten. Die Milzzell-Erythrozytensuspension wurde danach auf einen Ficoll-Isopaque Gradienten gegeben und zentrifugiert. Dadurch ließ sich eine Trennung von rosettierten Fc rezeptortragenden Zellen von nicht rosettierten, Fc 'rezeptornegativen' Zellen erreichen (Abb. 10). Normale Milzzellen, Fc 'negative' Zellen und Fc positive Zellen, die aus dem Sediment durch Lyse der Erythrozyten wiedergewonnen wurden, wurden dann entweder nur mit Antigen oder zusätzlich mit Antiserum kultiviert.

Alle drei Zellpopulationen wurden vor Kultivierung nochmals in ihrer Fc Rosettenbildung überprüft. Während die ursprüngliche Milzzellsuspension zwischen 20-40 % rosettenbildende Zellen besaß, war für die Fc 'negative' Fraktion in keinem Ansatz Fc Rosettenbildung nachweisbar.

Fc positive Zellen aus dem Sediment der Ficoll/Isopaque Trennung bildeten bei erneuter Testung unmittelbar nach Entfernung der Erythrozyten durch Lyse nur zu 12 % Rosetten und reagierten, wenn sie sofort kultiviert wurden, mit stark verminderten PFC Werten (im Vergleich zur Normalzellpopulation, Resultat nicht gezeigt). Inkubierte man diese Fc⁺ Fraktion vor Kultivierung und erneutem Rosettentest jedoch erst 2 bis 3 Stunden im CO₂ Brutschrank, erhielt man eine wesentlich höhere Fc Rosettenbildung und bessere PFC Werte.

Tab. 14 zeigt, daß sowohl Fc 'negative' als auch Fc positive Zellen zu einer PFC Antwort gegen SRBC in der Lage waren, wenngleich die Reaktion der Fc⁻ Population sehr viel schwächer war als die der Normalpopulation. Zugabe von Antiserum führte aber nur in Normal- bzw. Fc⁺ Zellkulturen zu einer Hemmung der PFC Antwort - die Reaktion der Fc⁻ Zellen gegenüber SRBC blieb durch Antiserum unbeeinflusst.

Fc Rosettenbildung

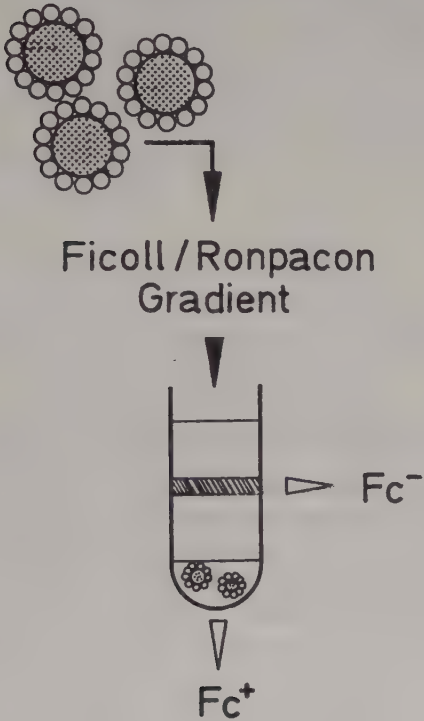


Abb. 10: Abtrennung Fc rosettenbildender Milzzellen
(Einzelheiten s. B 2.6.3).

	Normale Milz	Normale Milz + anti SRBC	Fc ⁺ Milz	Fc ⁺ Milz + anti SRBC	Fc ⁻ Milz	Fc ⁻ Milz + anti SRBC
PFC/10 ⁶	185	42	113	24	53	43
% Hemmung		77		79		19

Tab. 14: Einfluß von anti SRBC Serum auf die PFC Antwort von Normalzellen, Fc rezeptorpositiven(Fc⁺) sowie Fc rezeptornegativen(Fc⁻) Zellen im Mishell Dutton System. Normalzellen sowie Fc⁻ und Fc⁺ Zellen wurden mit und ohne Zusatz von 10 µl anti SRBC Serum (Titer ln 7) kultiviert. Zur Ermittlung der prozentualen Hemmwerte von Antiserum wurde die PFC Reaktivität der jeweiligen Zellpopulation ohne Antiserumzusatz gleich 100 % gesetzt.

Diese Versuchsdaten beweisen die zentrale Rolle des Fc Rezeptors bei der Immunregulation durch Antikörper, denn B Zellen, denen dieser Rezeptor fehlt, können durch Antikörper nicht in ihrer Funktion gehemmt werden. Nachdem in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt worden ist, daß der Antikörper nur mittels seines Fc Anteils hemmend wirksam werden kann, beweisen diese Untersuchungen zusätzlich, daß der Fc Rezeptor als Akzeptor für den Fc Anteil des Antikörpermoleküls fungiert.

Da der Fc Rezeptor auf mehreren Zelltypen vorkommt, war die Frage offen, welche Zellpopulation - B Zellen, T Zellen oder Makrophagen - als Zielzellen für das Fc Fragment des Antikörpers in Frage kommt.

3.7. Targetzelle der antikörpervermittelten Hemmung:

Falls die Annahme zuträfe, daß die Fc Rezeptoren auf T Zellen oder Makrophagen die Reaktionspartner für die Fc Fragmente der Antikörper darstellen, so sollte durch Entfernung dieser Zellpopulationen vor Kultivierung eine Verminderung des suppressiven Effektes von Antikörpern zu beobachten sein, da diesen dann der Reaktionspartner fehlen würde.

Um diese Hypothese zu testen, wurden Milzzellen von T Zellen (anti theta + Komplement) bzw. Makrophagen (Adhärenz an Plastik) befreit. Der für die anti SRBC Immunantwort notwendige Helfer-effekt wurde durch Zugabe von LPS zu den Kulturen ersetzt, das in vitro als T Zell- und Makrophagen-Ersatz wirkt (125). Während T zellfreie bzw. makrophagenverarmte Zellen ohne LPS-Zugabe kaum reagierten (Werte nicht aufgetragen), bewirkte LPS-Zugabe in beiden Fällen eine Reaktivität, die der der Normalkontrolle entsprach. LPS verursachte, wenn es der normalen Zellpopulation zugefügt wurde, eine Stimulation um etwa den Faktor 2 (s. Tab. 15).

	Milzzellen	Milzzellen + anti SRBC	Milzzellen + LPS	Milzzellen + LPS + anti SRBC
PFC/10 ⁶	100	13	236	30
% Hemmung		87		88

Tab. 15: Einfluß von LPS und anti SRBC Serum auf die Reaktivität von Normalzellen im Mishell Dutton System. Normale Milzzellen wurden mit und ohne Zugabe von 10 µl anti SRBC Serum (Titer 1n 7) auf ihre Reaktivität gegen SRBC getestet. Vergleichsweise wird die PFC Reaktivität von Normalzellkulturen dargestellt, die mit 25 µg LPS (mit oder ohne Antiserum) kultiviert worden waren.

Wie aus Abb. 11 hervorgeht, bewirkte die Zugabe von Antiserum sowohl in T zellverarmten als auch in makrophagenverarmten Kulturen einen Hemmeffekt auf die PFC Antwort, der dem in der Normalzellkultur voll entsprach. Aus Tab. 15 ist darüber hinaus zu entnehmen, daß auch die durch LPS induzierte Steigerung der Reaktivität von Normalzellen durch Zugabe von Antiserum gleichermaßen gehemmt werden kann.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Entfernung von T Zellen und Makrophagen vor Kultivierung keinen Einfluß auf die suppressive Wirkung von Antikörper auf die Immunantwort hat. In Ergänzung zu den in 3.6. erhobenen Befunden scheint somit erwiesen zu sein, daß der Reaktionspartner des Fc Stücks auf dem Antikörpermolekül der Fc Rezeptor auf der B Zelle ist.

3.8. Modell für den Wirkungsmechanismus der antikörpervermittelten Hemmung:

Die bisher vorliegenden Resultate zum Mechanismus der Hemmwirkung haben erbracht, daß die spezifische Ausschaltung der humoralen Immunantwort einmal abhängig ist von einem intakten Fc Fragment des Antikörpers, zum anderen vom Vorhandensein Fc rezeptortragender Zellen, wobei vermutlich hauptsächlich Fc rezeptortragende B Zellen die Zielzellen des Antikörpers sind. Es muß weiter berücksichtigt werden, daß die Ausschaltung antigenspezifisch ist.

Aufgrund dieser Befunde wurde das folgende hypothetische Schema aufgestellt (Abb. 12).

Durch gleichzeitige Bindung von Antigen-Antikörperkomplexen an den Antigenrezeptor und an den Fc Rezeptor der spezifischen B Zelle wird eine Vernetzung der beiden Rezeptoren bewirkt, die ein Negativsignal auf die betreffende Zelle zur Folge hat. Die Bindung des Antigens alleine an den Antigenrezeptor oder die Bindung eines Komplexes, der kein Fc Fragment besitzt, löst dagegen nur ein Positivsignal aus.

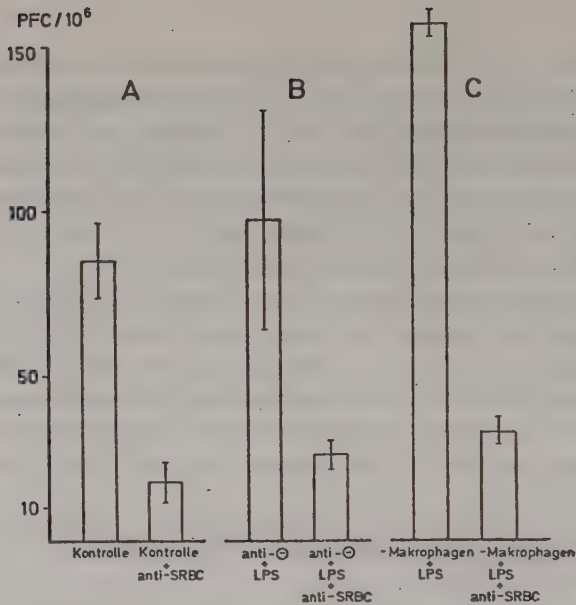


Abb. 11: Targetzelle der antikörpervermittelten Hemmung in vitro. Normale Milzzellen sowie T zellverarmte und makrophagenverarmte Milzzellen wurden mit oder ohne Zusatz von anti SRBC IgG (Titer 1n 7) kultiviert. Makrophagenverarmten bzw. T zellverarmten Zellkulturen wurden zusätzlich noch 25 μ l LPS beigegeben. Nach 4 Tagen wurde die PFC Antwort ermittelt.

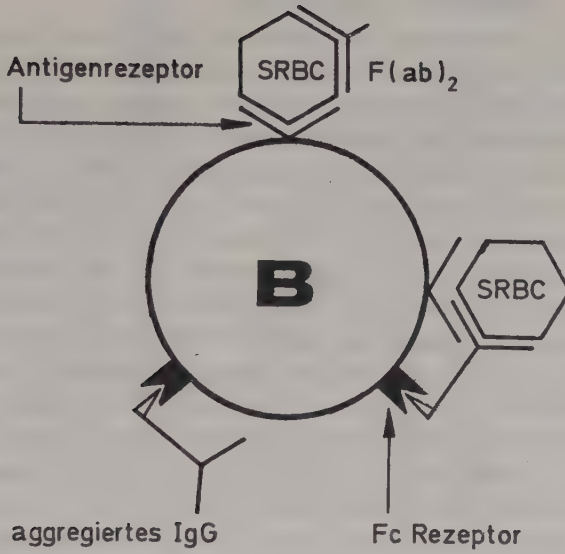


Abb. 12: Modell für den Wirkungsmechanismus der antikörpervermittelten Hemmung.

3.9. Vernetzung von Fc- und Antigenrezeptor als Voraussetzung der B Zellhemmung:

Für die Richtigkeit der unter 3.8. aufgeführten Hypothese mußte noch der Beweis erbracht werden, daß nur eine Vernetzung von Antigenrezeptor und Fc Rezeptor durch den spezifischen Antigen-Antikörperkomplex die Ausschaltung bewirken kann. Die Bindung eines unspezifischen Komplexes, der nur an den Fc Rezeptor der SRBC spezifischen B Zelle binden könnte ohne eine Möglichkeit der Bindung an den Antigenrezeptor zu haben, sollte demnach kein Negativsignal bewirken können. Als Modell eines Antigen-Antikörperkomplexes wurden hitzeaggregiertes Humangammaglobulin (HGG) sowie Rindergammaglobulin (BGG) verwendet. Die Hitzeaggregation verursacht eine Konformationsänderung, die der durch Bindung an ein Antigen verursachten Konformationsänderung entspricht. Mit Hilfe eines fluoreszenzserologischen Tests wurde die Bindung von aggregiertem bzw. nicht aggregiertem HGG an Lymphozyten überprüft. Dafür wurden Milzzellen mit aggregiertem bzw. nativem HGG inkubiert, anschließend gewaschen und mit einem fluoreszenzkonjugierten anti Humanglobulinserum nochmals inkubiert. Während die Vorinkubation mit nativem HGG nur eine schwache Fluoreszenz bewirkte (10 %), die vermutlich auf Kontamination mit aggregiertem Material beruht, die nur durch eine vorherige Ultrazentrifugation ausgeschlossen werden könnte, fluoreszierten Zellen, die mit hitzeaggregiertem HGG vorinkubiert waren, deutlich stärker (40%). Dieser Befund wird als Hinweis auf eine Anlagerung an Fc Rezeptoren gedeutet.

Im folgenden Experiment wurde Zellkulturen aggregiertes bzw. nichtvorbehandeltes HGG oder BGG in zwei verschiedenen Verdünnungen zugesetzt. Abb. 13 zeigt, daß Zugabe von nativem HGG bzw. BGG keine negative Beeinflussung der PFC Werte zur Folge hat. Aggregiertes HGG führt in der hohen Konzentration von 500 µg zu einer teilweisen Suppression, die für eine Dosis von 250 µg jedoch bereits nicht mehr nachweisbar ist.

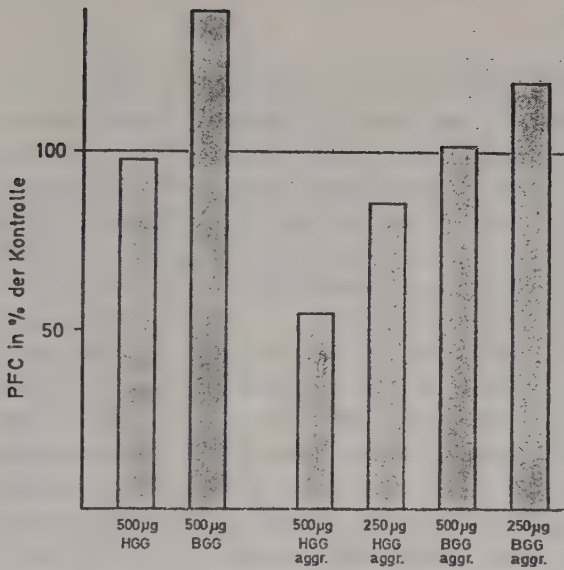


Abb. 13: Einfluß von aggregiertem (und nativem) Immunglobulin auf die PFC Antwort in vitro.

Nichtvorbehandeltes sowie hitzeaggregiertes HGG bzw. BGG wurden in einer Proteinkonzentration von 500 µg bzw. 250 µg normalen Milzzellen zugesetzt. 4 Tage später wurde die PFC Antwort der Kulturen ermittelt und in % der Normalkontrolle (= 100 %) aufgetragen.

Dagegen bewirkt aggregiertes BGG in beiden Konzentrationen keine Hemmung.

Diese Untersuchungen konnten weiter gestützt werden durch Verwendung isolierter Fc Fragmente, deren Bindungsvermögen an Fc Rezeptoren bekannt ist (96). Eine Zugabe dieser Fc Fragmente sowohl in Mishell Dutton als auch in Marbrook Kulturen in mehreren Verdünnungen beeinflusste die PFC Bildung nicht, bzw. in der höchsten eingesetzten Konzentration (in einem der Testansätze) nur in unwesentlichem Ausmaß (Abb. 14).

Diese Experimente lassen darauf schließen, daß die Besetzung des Fc Rezeptors alleine in der Regel kein Negativsignal auslöst. Es bestand aber immer noch die Möglichkeit, daß eine Bindung unabhängig voneinander an den Antigenrezeptor einerseits und an den Fc Rezeptor andererseits auch ohne Vernetzung untereinander ein Negativsignal bewirken könnte. Zur Untersuchung dieser Frage, wurden $F(ab)_2$ anti SRBC Fragmente, die zusammen mit Antigen den Antigenrezeptor besetzten, mit aggregiertem HGG, das von Fc Rezeptoren gebunden wurde, in Kultur gegeben. Wie Abb. 15 zeigt, bewirkte auch diese gleichzeitige, aber voneinander unabhängige Anlagerung an die beiden Rezeptoren keine Hemmung der PFC Antwort.

Diese Befunde stützen das Konzept, daß eine Vernetzung von Antigenrezeptor und Fc Rezeptor Voraussetzung für die antikörpervermittelte Hemmung ist. Daß die Vernetzung auf ein und derselben Zelle stattfindet, ist zwar die übersichtlichste und einfachste Vorstellung, sie ist aber durch den Versuchsansatz zur Bestimmung der Targetzelle (s. Abb. 11) allein nicht schlüssig beweisbar, da eine völlige Elimination vor allem von Makrophagen technisch kaum möglich ist. Um die Frage nach einer Beteiligung von Fc Rezeptoren verbleibender T Zellen oder Makrophagen an der antikörpervermittelten Immunregulation weiter abzuklären, mußte deshalb

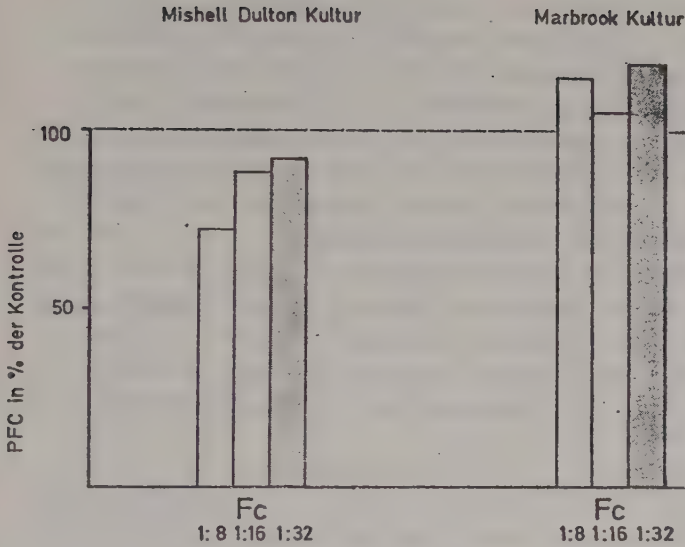


Abb. 14: Einfluß von isolierten Fc Fragmenten auf die PFC Antwort in vitro.

Isolierte Fc Fragmente wurden in Verdünnungen von 1:8, 1:16 und 1:32 (Ausgangskonzentration 1 % Proteingehalt) sowohl Marbrook als auch Mishell Dutton Kulturen zugesetzt. 4 Tage später wurde die PFC Antwort ermittelt und in % der Normalkontrolle (= 100 %) aufgetragen.

ein anderer Weg gewählt werden.

Dafür schien sich ein Versuchsansatz anzubieten, in dem Fc negativen Zellen im Mishell Dutton System Fc rezeptor-tragende Zellpopulationen zugemischt wurden. Falls die Ver-netzung von Antigenrezeptor und Fc Rezeptor auf ein und derselben antigenspezifischen B Zelle stattfindet, würde die Zumischung einer zwar Fc rezeptortragenden aber anti-genrezeptorfreen Population, wie sie z.B. Makrophagen dar-stellen, keine Rekonstitution der Hemmwirkung von Antikörpern in Fc negativen Kulturen bewirken können.

Für den Fall aber, daß Antikörper über Bindung an Fc Rezeptoren anderer als der antigenspezifischen B Zellen ein Negativsignal auslösen (z.B. Fc positive 'suppressor Zellen'), so würde die Zugabe einer Fc rezeptorhaltigen Zellpopulation eine Rekonstitution der Hemmwirkung von Antikörpern zur Folge haben.

Tab. 16 zeigt das Ergebnis des Zumischexperiments.

Im Kontrollansatz wurde wiederum gezeigt, daß die PFC Bildung normaler Milzzellen durch Antikörper gehemmt, diejenige von Fc negativen Milzzellen nicht gehemmt werden kann. Die Zumi-schung von 5×10^5 Peritonealzellen, von denen 38 % Fc Rosetten bildeten, führten zu einer deutlichen Vermehrung der Plaques in der Fc negativen Kultur. Diese PFC ließen sich durch Zugabe von Antiserum jedoch nicht hemmen. Der Grund für die nicht hemmbare Vermehrung der PFC dürfte in einer Substitution von Makrophagenhilfe für Fc negative B Zellen liegen, da ein großer Teil der Makrophagenpopulation Fc Rezeptoren besitzt und daher bei der Präparation der Fc negativen Zellen abge-trennt wurde.

Aus diesem Versuch ist ersichtlich, daß die Fc Rezeptoren von Makrophagen nicht als Reaktionspartner des Fc Fragmentes bei der antikörpervermittelten Hemmung von B Zellen in Frage kommen können.

	PFC/10 ⁶	% Hemmung
Normale Milz	150	
Normale Milz + anti SRBC	25	83
Fc ⁻ Milz	21	
Fc ⁻ Milz + anti SRBC	25	keine
Fc ⁻ Milz + Peritonealzellen	123	
Fc ⁻ Milz + Peritonealzellen + anti SRBC	192	keine
Fc ⁻ Milz + normale Zellen	46	
Fc ⁻ Milz + normale Zellen + anti SRBC	27	41

Tab. 16: Einfluß einer Zumischung von Fc rezeptortragenden Peritonealzellen oder Normalzellen auf die Reaktivität Fc negativer Zellen im Mishell Dutton System.

Normalzellen sowie Fc negative Zellen wurden mit und ohne Zusatz von 10 µl anti SRBC Serum (Titer ln 7) kultiviert. Der Fc negativen Zellpopulation wurden außerdem entweder 5 x 10⁵ Peritonealzellen (30 % Fc positiv) oder 5 x 10⁵ Normalzellen (30 % Fc positiv) zugesetzt und auch diese Ansätze jeweils mit und ohne Zusatz von Antiserum kultiviert. Zur Ermittlung der prozentualen Hemmwerte von anti SRBC Serum wurde die PFC Reaktivität der jeweiligen Zellpopulation ohne Zusatz von Antiserum gleich 100 % gesetzt.

Eine Zumischung von normalen Milzzellen (5×10^5 , 30 % Fc Rosettenbildung) führte ebenfalls zu einer leichten Verbesserung der Reaktionsfähigkeit gegen SRBC, in diesem Fall bewirkte aber die Zugabe von Antikörper wieder eine Hemmung (41 %), was darauf schließen läßt, daß sich in der zugemischten Normalmilzzellpopulation Zellen befinden, die sensitiv für eine Hemmung durch Antikörper sind. Im Gegensatz zu der Zugabe von Peritonealzellen ist die geringe Verbesserung der PFC Antwort nach Zumischung normaler Milzzellen nicht Ausdruck eines Helfereffektes, sondern einer Mitreaktion zugemischter B Zellen, die selbst durch Antikörper hemmbar sind. Nach Zumischung Nylonwolle - angereicherter Zellen (s. Methode), die zu ca. 98 % aus T Zellen bestehen (Resultat nicht gezeigt), findet sich weder eine wesentliche Verbesserung der Plaquezahl noch eine Verbesserung der Hemmbarkeit Fc negativer Milzzellen durch Antikörper. Hinsichtlich der Frage, ob Fc positive T Zellen durch Antikörper zur Hemmung von B Zellen veranlasst werden können, hat dieser Versuch noch kein schlüssiges Resultat erbracht, da nur 3 % der zugemischten T Zellen Fc positiv waren.

Diese haben jedoch offensichtlich für Fc negative B Zellen keine oder gegenüber Peritonealzellen deutlich geringere Helferfunktion. Diese Interpretation basiert auf der Beobachtung von Miyama (85), wonach T Helferzellen Fc negative Zellen sind, sie stützt sich in der hier vorgelegten Versuchsanordnung auf den Grundsatz Fc negativer Milzzellen (in dem also T Helferzellen enthalten sein müßten) mit relativ geringer PFC Zahl, der mit dem Ergebnis nach Zumischung von T Zellen voll übereinstimmt.

Die in Tab. 16 wiedergegebenen Untersuchungen ergeben zusammengefaßt keinen Hinweis dafür, daß die Fc Rezeptoren anderer als der antigenspezifischen B Zellen als Angriffspunkt für den Antikörper wirken. Somit scheint die oben postulierte Vernetzung von Antigen- und Fc Rezeptor, die zur Ausschaltung der humoralen Immunreaktivität führt, auf der antigenspezifischen

B Zelle selbst stattzufinden.

Eine hypothetische Möglichkeit besteht allerdings noch darin, daß eine suppressiv wirkende Subpopulation von B Zellen über ihren Fc Rezeptor mit der reagiblen spezifischen B Zelle über einen Antigen-Antikörperkomplex interagiert. Analog zu der Wirkungsweise von T suppressor Zellen müßte auch diese Art von Hemmung über die Freisetzung von Hemmfaktoren aus den 'suppressor B Zellen' wirksam werden. Für die Existenz derartiger Faktoren besteht derzeit kein Hinweis.

Ein Versuch, diese hypothetische Möglichkeit auszuschließen, wurde mit folgendem Experimentalansatz unternommen. Mit Hilfe eines Cyclophosphamidanalogs (Asta 5122) wurde nach etablierter Weise Toleranz gegenüber SRBC induziert, bei der es sich um einen selektiven Reaktionsdefekt auf der B Zellebene handelt (Lemmel, persönliche Mitteilung). B Zellen von toleranten Tieren wurden Fc negativen Zellkulturen zugemischt. Es zeigte sich, daß deren PFC Werte weiterhin durch Antikörper nicht hemmbar waren, was eine Beteiligung von Fc Rezeptoren der postulierten B Subpopulationen als Reaktionspartner für das Fc Fragment weitgehend ausschließt, so daß die Annahme einer direkten negativen Beeinflussung der reagiblen B Zelle durch Antikörper auch durch diesen Versuch weiter gestützt wird.

3.10. Vergleich antikörpervermittelter Hemmung bei jungen und alten Mäusen:

Da es in der Literatur Hinweise darauf gibt, daß der Fc Rezeptor ein Merkmal für den Reifegrad einer Zellpopulation darstellt (32) sollte nachgeprüft werden, ob bei sehr jungen Tieren im Vergleich zu älteren Tieren eine geringere Anzahl Fc rezeptortragender Zellen vorhanden ist und somit eine schwächere antikörpervermittelte Hemmung nachweisbar sein würde. Tab. 17 zeigt die PFC Werte von Milzzellkulturen 7 Tage alter Mäuse mit und ohne Zusatz von Antiserum im Vergleich zu den PFC Werten von entsprechenden Milzzellkulturen 3 Monate alter Mäuse.

Ein Unterschied in der Hemmwirkung von Antikörpern zwischen den beiden Gruppen war nicht nachzuweisen, was darauf schließen läßt, daß 7 Tage nach Geburt schon genügend 'reife' Fc rezeptortragende B Zellen vorhanden sind.

	3 Monate alte Tiere		7 Tage alte Tiere	
	Milzzellen	Milzzellen + Antikörper	Milzzellen	Milzzellen + Antikörper
PFC/10 ⁶	200	44	156	42
% Hemmung		78		73

Tab. 17: Hemmwirkung von anti SRBC Serum in Milzzellkulturen junger und alter Mäuse.

D Diskussion

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fragestellung liegt die Annahme zugrunde, daß das Immunsystem in Analogie zu anderen biologischen Systemen Regelmechanismen unterliegt, die seine Reaktionsintensität kontrollieren. Die eigenen Untersuchungen sollten in diesem Zusammenhang zur Aufklärung des Mechanismus beitragen, über den B Zellen bzw. deren Produkte in antigenspezifischer Weise hemmend auf die Funktion von B Zellen einwirken.

Die ersten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, daß neben der bekannten T zellvermittelten Regulation der humoralen Immunantwort (T suppressor Zellen 51, 53) auch eine durch B Zellen bewirkte Immunregulation besteht. Unter geeigneten Bedingungen, die grundsätzlich einigen Versuchsanordnungen zum Nachweis von T suppressor Zellen entsprechen, d.h. Hyperimmunisierung von Spendertieren und darauffolgendem Milzzelltransfer in syngene, unbehandelte Empfänger, wirkten schon 1.6×10^4 Zellen suppressiv auf die Immunantwort der Empfänger gegenüber dem zur Immunisierung verwendeten Antigen. Durch selektive Elimination von Makrophagen und T Zellen aus dem Transfermaterial, wodurch der Hemmeffekt nicht reduziert wurde, ließ sich nachweisen, daß eine Übertragung von B Zellen hemmend auf den Empfänger wirkt. Diese Hemmung der Immunantwort ist streng antigenspezifisch, d.h. sie bezieht sich auf das Antigen, das zur Immunisierung des Spenders benutzt wurde.

Eine weitere Differenzierung konnte wahrscheinlich machen, daß für die Hemmung nicht die zur IgM-, sondern ausschließlich die zur IgG Produktion befähigten Zellen des Spendermaterials verantwortlich sind. Während bereits die Übertragung von 30 IgG bildenden Zellen eine Suppression der Empfängerantwort bewirkte, führte die Übertragung IgM bildender Zellen eher zu einer Erhöhung der Empfängerantwort. Ob es sich hierbei

wirklich um eine gesteigerte Reaktionslage der Empfänger handelt, wurde im Rahmen der hier bearbeiteten Fragestellung nicht näher untersucht. Diese Annahme erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da dasselbe Phänomen auch nach Transfer unbehandelter, syngener Milzzellen beobachtet werden konnte (s. Tab. 3).

Morris und Möller (90) untersuchten ebenfalls die Wirkung eines Transfers hyperimmuner Milzzellen auf die Immunantwort unbehandelter Empfängertiere. Diese Autoren fanden jedoch nur eine Suppression der IgM PFC der Empfängertiere, während sie eine gleichzeitige Stimulation der IgG PFC feststellten. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war zwar der prozentuale Anteil von IgG PFC an der Gesamtantwort in den Empfängertieren im Vergleich zu IgG PFC der normalen Primärkontrolle erhöht (durchschnittlich 40 % gegenüber 15 % IgG PFC bei der Kontrollgruppe), aber die IgG PFC Werte der Empfänger hyperimmuner Milzzellen lagen in allen Fällen unter denen der Kontrollgruppe (s. auch Tab. 2). Die prozentuale Verschiebung von IgG PFC zu IgM PFC in den Empfängertieren läßt sich ohne weiteres damit erklären, daß die Übertragenen IgG bildenden Zellen der Spendertiere bei der Bestimmung der Empfängerreaktion mit nachgewiesen werden, bzw., daß diese Zellen alleine die in den Empfängertieren nachgewiesenen PFC darstellen, während die empfängereigene Immunantwort je nach Dosis Übertragener suppressiver Zellen und Zeitpunkt der Testung völlig ausgeschaltet ist.

Diese Annahme erscheint insbesondere nach der in Tab. 2 wiedergegebenen Dosis-Wirkungsrelation gerechtfertigt: Die Zahl der IgM bildenden Zellen des Empfängers nimmt mit zunehmender Zahl der IgG bildenden Zellen kontinuierlich ab, während die Zahl der IgG bildenden Zellen schon bei niedriger Transferdosis nur noch ca. 10 % der Kontrollwerte ergibt und über einen breiten Dosisbereich auf diesem Plateau verbleibt.

Daraus wird geschlossen, daß die Hemmwirkung des Transfermaterials die Ausbildung von IgM PFC selbst, sowie die Differenzierung von IgM nach IgG betrifft, so daß in hoher Dosierung

im Empfänger ganz überwiegend IgG PFC (vermutlich vom Spendermaterial) nachweisbar sind. In den weiteren Untersuchungen wurde auf die Darstellung der Einzelwerte für IgM PFC bzw. IgG PFC verzichtet - in allen Kurven und Tabellen sind der Übersichtlichkeit halber jeweils nur Gesamt PFC Werte (IgM und IgG) verzeichnet.

Aus den vorliegenden Daten über die Dauer der B zellvermittelten Hemmung (Abb. 1, 2) geht hervor, daß der Hemmeffekt nach zweimaliger Immunisierung der Spender sowohl im Spender als auch im Empfänger bis zu 21 Wochen nachweisbar blieb. Daß die überraschend lange Hemmdauer nicht auf der Gegenwart antigenspezifischer Zellen beruhte, sondern auf der Gegenwart von deren Produkten - den spezifischen IgG Antikörpern - konnte eindeutig nachgewiesen werden.

Hierfür sprach der Befund, daß 21 Wochen nach Transfer bzw. 23 Wochen nach zweiter Immunisierung der Spender zwar noch in beiden Fällen antigenspezifische Gedächtniszellen nachweisbar waren, eine Hemmwirkung jedoch nicht mehr bestand. Durch Reaktivierung der Gedächtniszellen zur Antikörperproduktion mit Hilfe von Antigen im Spender bzw. mit Hilfe von LPS im Empfänger konnte der Hemmeffekt wieder erreicht werden.

Die Vermutung, daß die Rekonstitution der Hemmwirkung nach LPS Gabe wirklich auf die Produktion von SRBC spezifischen Antikörpern zurückzuführen ist, wurde unter anderem dadurch nahegelegt, daß LPS alleine in unbehandelten Empfängern eine SRBC spezifische Immunantwort induzierte, die in ihrer Kinetik, sowohl hinsichtlich IgM Bildung als auch hinsichtlich IgG Bildung qualitativ mit der durch Antigen hervorgerufenen Antwort übereinstimmte. Die Etablierung eines spezifischen immunologischen Gedächtnisses ist dagegen mit LPS alleine - also in Abwesenheit von Antigen - nicht möglich (s. Tab. 6). Diese Tatsache erklärt ihrerseits, daß 21 Wochen nach Transfer nur die Empfänger immuner Zellen nach LPS Behandlung in ihrer Reaktivität gegenüber dem spezifischen Antigen wieder

gehemmt sind. Nur diese Tiere besitzen nämlich eine erhöhte Anzahl potentiell IgG bildender spezifischer Gedächtniszellen aus dem Transfermaterial, während in unbehandelten Normaltieren die durch LPS hervorgerufene IgG Produktion zum Zeitpunkt der Testimmunisierung (5 Tage nach LPS Gabe) nur 10 % der Gesamtantwort beträgt und somit zu gering ist, um eine starke Hemmung zu induzieren. Eine geringfügige Hemmung (ca. 20 %) ist allerdings konstant nachzuweisen und kann ohne weiteres den 10 % IgG bildenden Zellen zugeschrieben werden.

In Untersuchungen von Diamantstein (29) sowie Ulla Persson (97) wurde ebenfalls eine Suppression von SRBC Plaques nach Vorbehandlung mit LPS beschrieben.

Diamantstein führte den Effekt darauf zurück, daß LPS Stimulation ohne Antigen zur Aktivierung einer Population von B Zellen führt, die dann das Antigen nicht mehr erkennen kann. Dies ist jedoch auf Grund der oben erwähnten Ergebnisse als Ursache der Suppression eher unwahrscheinlich.

Ulla Persson dagegen, die trotz Entfernung von T Zellen und Makrophagen den LPS induzierten Suppressionseffekt erhalten und somit auf der B Zellebene lokalisieren konnte, postulierte eine B-suppressor Population, die nach Aktivierung durch LPS unspezifische Immunglobuline freisetzt und somit eine Suppression der spezifisch reagiblen B Zellen bewirkt. Dieses Postulat beruhte darauf, daß Ulla Persson nach LPS Gabe alleine keine Bildung spezifischer Antikörper (z.B. Plaquetest) feststellen konnte. In den eigenen Befunden ist die Induktion spezifischer Antikörper jedoch eindeutig nachweisbar, so daß die Beteiligung eines die humorale Immunreaktion unspezifisch hemmenden Immunglobulins bei der LPS induzierten Suppression unwahrscheinlich ist. Daß die grundsätzlich polyklonale B Zellaktivierung durch LPS tatsächlich zu der Freisetzung antigenspezifischer Immunglobuline führt, konnte insbesondere durch den Versuch zur Reaktivierung von Gedächtniszellen bewiesen werden, in dem die LPS induzierte Hemmung eine Antigenpezifität aufwies.

Der Grund für die nicht nachweisbare Plaquebildung gegen SRBC nach LPS Gabe in den Versuchen von Ulla Persson könnte in der Wahl des Mäusestammes liegen. Auch in unseren Untersuchungen zeigten F1 Hybride des Stammes C57Bl/6 xA, wie sie bei Persson benutzt wurden, keine Plaques nach LPS Gabe, während CBA und NMRI Tiere eine gute Antwort gegen SRBC ausbildeten. Die Untersuchungen von Andersson et al. (4), die ebenfalls Unterschiede in der Anzahl mitogenreaktiver B Zellen bei den verschiedenen Mäusestämmen ergaben, würden dieser Interpretation voll entsprechen.

Die Frage, warum die Hemmwirkung von hyperimmunem Transfermaterial 21 Wochen nach Transfer nur durch eine unspezifische Reaktivierung der Antikörperbildung durch LPS, nicht aber mit Hilfe des spezifischen Antigens wieder induziert werden kann, läßt sich vor allem durch die Versuche zur Zeitkinetik der antikörperbedingten Hemmung (C 3.4.) erklären.

Danach wirkt nämlich der spezifische Antikörper nur hemmend auf die Immunantwort, wenn er gleichzeitig oder kurz nach Antigen verabreicht wird. Die Testimmunisierung mit dem spezifischen Antigen 21 Wochen nach Transfer kann zwar die noch vorliegenden, vom Spender stammenden Gedächtniszellen im Empfänger reaktivieren, jedoch kommt deren IgG Bildung wahrscheinlich zu spät, um die bereits gleichzeitig angelaufene IgM Antikörperproduktion des Empfängers noch zu hemmen.

LPS dagegen, daß selbst keinen selektiven Stimulus für die anti SRBC Produktion darstellt, aktiviert unspezifisch eine große Anzahl von B Zellen, unter ihnen die in relativ hoher Frequenz vorliegenden Gedächtniszellen des Spenders, die sofort mit der Produktion von spezifischem IgG beginnen können. Dadurch liegt zum Zeitpunkt der Testimmunisierung mit SRBC bereits ein erhöhter, gegen SRBC gerichteter IgG Spiegel vor, der die Aktivierung der empfängereigenen spezifischen B Zellen hemmen kann.

Im Hinblick auf die langdauernde Hemmung durch übertragene hyperimmune Milzzellen muß man daher annehmen, daß 17 Wochen

nach dem Transfer, zu einem Zeitpunkt also, zu dem noch eine ca. 40 %ige Hemmung der Empfängerantwort nachgewiesen werden kann, noch von Spenderzellen stammende IgG Antikörper im Empfängerorganismus zirkulieren. Für den Erhalt eines Antikörperspiegels sind grundsätzlich 3 Faktoren ausschlaggebend: Persistenz des Antigens und die hierdurch aufrechterhaltene Aktivierung der B Zelle, die Produktionsdauer der B Zelle nach antigener Aktivierung und schließlich die Halbwertszeit des produzierten Immunglobulins.

Die Produktionsdauer von B Zellen nach Antigenexposition ist schwer definierbar, es ist jedoch unwahrscheinlich, daß eine derart langandauernde Antikörperproduktion wie sie in den vorgelegten Transferexperimenten beobachtet wurde, ohne anhaltende antigene Stimulierung stattfinden kann (58, 86). Deshalb bleibt nur die Annahme, daß beim Transfer von Milzzellen hyperimmuner Spender Antigen mitübertragen wurde, was trotz mehrmaligen Waschens der Zellsuspension von Transfer insbesondere für ein partikuläres Antigen wie SRBC nicht ausgeschlossen werden kann. Nimmt man nun eine Mitübertragung von Antigen als gegeben an, so stellt sich die Frage, ob eine derartig lange Persistenz der SRBC, wie sie zur Aufrechterhaltung der Antikörperproduktion über 17 Wochen notwendig wäre, überhaupt möglich ist.

Untersuchungen von Britton et al. (17) zur Überlebenszeit von SRBC-Antigen in vivo ergaben eine Mindestüberlebenszeit von 3 Wochen, es wurde jedoch wahrscheinlich gemacht, daß in Wirklichkeit dieses Antigen wesentlich länger persistiert.

Somit existiert kein zweifelsfreier Befund für die Überlebenszeit von SRBC-Antigen in vivo. Die Zeitspanne, für die eine Anwesenheit von Antigen im Empfänger zur Erklärung der langanhaltenden Hemmung postuliert werden muß, läßt sich jedoch wesentlich verringern, wenn man die Hemmdauer von passiv applizierten Antikörpern als Vergleich heranzieht. Dieser Versuch ergab eine Hemmdauer von ca. 9 Wochen (Abb. 5).

Wenn man diese Zeitspanne mit der Katabolisierungszeit einer

bestimmten Menge Antikörper gleichsetzt, würde im Hinblick auf die 17 Wochen andauernde Hemmwirkung von transferierten Immunzellen eine um die Katabolisierungszeit von Antikörper kürzere Zeitspanne für die Persistenz von Antigen als Erklärung dieses Hemmeffektes ausreichen. Ein direkter Beweis für derartige Überlegungen ist jedoch unmöglich.

Zusammenfassend zeigen die bisher diskutierten Daten, daß man der durch T suppressor Zellen bewirkten spezifischen Immunregulation (43, 53, 9) eine spezifische Regulation durch 'B suppressor Zellen' gegenüberstellen kann. Die langanhaltende immunsuppressive Wirkung dieser Zellen beruht jedoch nicht auf deren Präsenz, sondern auf der Freisetzung spezifischer IgG Antikörper aus Übertragenen B Zellen im Empfänger. Dieser Befund sollte bei Experimenten zum Nachweis von T suppressor Zellen berücksichtigt werden. Da in vielen Fällen der Experimentalansatz auch hier eine Vorimmunisierung und anschließenden Transfer beinhaltet (131, 12), muß die Beteiligung von auf diese Weise mitaktivierten 'B suppressor Zellen' sorgfältig ausgeschlossen werden.

In den anschließenden Untersuchungen zur Aufklärung des Hemmmechanismus der antikörpervermittelten Immunregulation wurden spezifische IgG Antikörper jeweils 1 Stunde vor Antigen passiv appliziert.

Untersuchungen von Sinclair (123) sowie Wason und Fitch (139) wiesen darauf hin, daß der Antikörper, um hemmend wirken zu können, ein intaktes Fc Fragment besitzen muß. $F(ab)_2$ Fragmente des spezifischen Antikörpers besaßen nur 1/100 bis 1/1000 der Hemmaktivität von intaktem Antikörper (124, 75) und wirkten nur dann noch geringfügig suppressiv, wenn sie gleichzeitig mit Antigen verabreicht wurden (22). Dagegen erhielten Feldmann und Diener (45) keine Unterschiede in der Hemmwirkung zwischen intaktem Antikörper bzw. $F(ab)_2$ Fragmenten.

Aus diesem Grunde wurde die Bedeutung des Antikörper Fc Fragmentes bei der Hemmung nochmals überprüft. Es konnten

zunächst die oben genannten Befunde bestätigt werden, wonach eine Hemmung der Immunantwort nur mit einem intakten IgG Molekül, nicht aber mit $F(ab)_2$ Fragmenten erreicht werden konnte.

Für einen zusätzlichen Beweis dieser Befunde wurde versucht, die Hemmwirkung von $F(ab)_2$ Fragmenten durch künstliche Substitution mit einem Fc Stück über Zugabe eines zweiten, gegen das $F(ab)_2$ Fragment gerichteten Antikörpers zu rekonstituieren. Dieser Versuch verlief in vivo nicht befriedigend, wofür hauptsächlich wohl die beschleunigte Katabolisierung von Antikörperfragmenten verantwortlich gemacht werden muß (126). Der Versuch wurde daher in vitro wiederholt, aber auch hier verliefen zunächst fast alle Experimente negativ, in denen $F(ab)_2$ Fragmente (vom Kaninchen) und anti Kaninchen γ Globulin unabhängig voneinander in die Kultur gegeben wurden. Die Ursache hierfür lag vermutlich darin, daß anti Kaninchen γ Globulin keine sehr starke Affinität für die $F(ab)_2$ Fragmente besitzt, da diesen der größte Teil der schweren Kettendomäne fehlt, gegen die das Antiserum gerichtet ist. Eine Vorinkubation der beiden Präparationen in einer Verdünnung, die in einer Ouchterlony Immundiffusion ein deutliches Präzipitat ergab, führte dagegen zu einer erfolgreichen Rekonstitution der Hemmung (Abb. 9). Dieses Ergebnis beweist somit die Notwendigkeit eines intakten Fc Fragmentes auf dem Antikörpermolekül für die Hemmwirkung. Zusätzlich wurde jedoch gezeigt, daß hierbei das Fc Fragment beliebig austauschbar ist. Dies bedeutet gleichzeitig, daß das streng antigenspezifische Phänomen der antikörpervermittelten Immunsuppression von der Mitwirkung eines antigenunspezifischen Reaktionspartners (Fc Fragment) abhängt.

Obwohl die Wichtigkeit der Fc Anteile von Antikörpern bei der Immunregulation schon relativ früh postuliert wurde, blieb ihr wahrscheinlicher Angriffspunkt auf zellulärer Ebene ungeklärt. Es lag nahe, als Akzeptor auf der Zellmembran einen im Hinblick auf das Antigen ebenfalls unspezifischen Reaktionspartner zu vermuten. Hierfür kam insbesondere der Fc Receptor in Frage.

Basten (10) beschrieb 1972 einen Rezeptor auf B Zellen, der Antikörper über ihren Fc Anteil binden konnte, wenn sie durch Bindung an Antigen oder durch Hitzeaggregation in ihrer Konformation geändert waren. Später wurde der Fc Rezeptor, der bei der Maus vor allem Antikörper der Klassen IgG-1, IgG-2a und IgG-2b band (103) auch auf einigen T Zellpopulationen gefunden (5, 129, 142).

Als Bindungsstelle auf dem Antikörper fungiert die CH3 Domäne (104). Bei der Bindung an den Fc Rezeptor konnte die Beteiligung von Komplement, das im Bereich der CH2 Domäne fixiert wird, weitgehend ausgeschlossen werden (10). Auch auf Makrophagen können Fc Rezeptoren nachgewiesen werden, die für die Fokussierung von Immunkomplexen zur Initiation der Phagozytose von Bedeutung sind (117, 78).

Die Beobachtung, daß Fc Rezeptoren auf B Zellen mit Ia Antigenen assoziiert sind, die von der immune response Genregion im H-2 Komplex codiert werden (30), führte ebenfalls zu der Vermutung, daß diesem Rezeptor eine Rolle bei der Immunregulation zukommt.

Hierfür gibt es in der Literatur zusätzliche Befunde.

Die von Ramasamy et al. (105) vorgeschlagene Funktion als Prorezeptor für später als Antigenrezeptor fungierendes Immunglobulin ließ sich nicht bestätigen, da viele Immunglobulinrezeptoren eine IgM ähnliche Struktur besitzen - IgM Moleküle aber nicht an Fc Rezeptoren binden.

Abbas & Unanue (1) wiesen darauf hin, daß zwischen Antigenrezeptoren und Fc Rezeptoren eine Assoziation besteht, da die Bindung von Liganden an Antigenrezeptoren (anti Immunglobulin) zum co-capping der beiden Rezeptoren führt.

Die Bindung von Liganden an Fc Rezeptoren bewirkte dagegen nur capping dieser Rezeptoren und beeinflusste die Verteilung von Antigenrezeptoren nicht. Aus diesen Versuchen wurde die Vermutung abgeleitet, daß eine Interaktion der beiden Rezeptoren eine Rolle bei der Aktivierung der B Zelle spielt.

Müller & Coutinho (88) untersuchten die Beteiligung von Fc Rezeptoren an der polyklonalen Aktivierung von B Zellen zur Antikörperproduktion durch LPS und andere unspezifische B Zellaktivatoren. Sie konnten keine B Zellaktivierung durch Triggerung von Fc Rezeptoren erreichen, während Berman & Weigle (13) durch Besetzung von Fc Rezeptoren mit hitzeaggregiertem Gammaglobulin eine Aktivierung der DNA Synthese von B Zellen erhielten.

Zu diesen sich teilweise widersprechenden Untersuchungen zur Teilnahme von Fc Rezeptoren bei der Aktivierung von B Zellen kam der Befund von Ryan und Henkart (111), daß die Bindung an Fc Rezeptoren zur Hemmung der B Zellantwort führt. Diese beiden Autoren schlugen außerdem ein Konzept für die Rolle des Fc Rezeptors bei der antikörpervermittelten Hemmung vor, wofür aber keine experimentellen Beweise erbracht wurden.

In den vorliegenden Untersuchungen zur antikörpervermittelten Hemmung konnte der Beweis erbracht werden, daß der Fc Rezeptor bei der Immunsuppression durch Antikörper direkt beteiligt ist (s. Tab. 14).

Während normale und Fc^+ Milzzellen durch Antikörper stark supprimiert wurden, ließ sich die Reaktion der Fc^- Zellen durch Antikörper nicht negativ beeinflussen.

Die Reaktion der Fc^- Zellen war jedoch insgesamt sehr viel niedriger als die der Normalkontrolle. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine Verschiebung in der Relation von B zu T Zellen in diesem Ansatz. Da wesentlich mehr B Zellen Fc Rezeptoren tragen als T Zellen, enthält die Fc negative Zellpopulation relativ mehr T Zellen als die Normalpopulation, da alle Fc rezeptortragenden Zellen durch die Trennmethode eliminiert wurden. Diese Vermutung wird durch eine Untersuchung von Miyama et al. (85) bestätigt, wonach in Fc negativen Zellpopulationen nur 20 % B Zellen gegenüber 39 % in Normalpopulationen und 60 % in Fc positiven Populationen vorhanden sind.

Ein weiterer Grund für die schwache Reaktion der Fc negativen Zellen dürfte eine starke Makrophagenverarmung sein, da die Mehrzahl der Makrophagen Fc Rezeptoren tragen und deshalb ebenfalls eliminiert wurden. Dieser Defekt konnte durch Zumischung von Peritonealzellen, die ca. 80 % Makrophagen enthalten teilweise aufgehoben werden (s. Tab. 16).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zielzelle der antikörpervermittelten Hemmung zu definieren.

Die Funktion des Fc Rezeptors als Angriffspunkt des Antikörper Fc Stückes stand fest, aber seine Anwesenheit auf mehreren Zelltypen ließ noch keinen Schluß über den möglichen Wirkungsmechanismus zu. Theoretisch bestand die Möglichkeit einer Bindung von Antikörper Fc Anteilen sowohl an Fc Rezeptoren von B Zellen als auch an Fc Rezeptoren auf T Zellen und Makrophagen. In den beiden letzteren Fällen würde die Hemmung der spezifischen B Zelle nicht direkt erfolgen, sondern nur über einen zweiten Schritt - möglicherweise über Freisetzung hemmender Faktoren.

Die in der Literatur vorliegenden Hinweise für eine Beteiligung von T Zellen und Makrophagen bzw. deren Fc Rezeptoren bei der Immunregulation durch Antikörper werden im folgenden kurz zusammengefaßt.

Bereits 1974 wurde eine Abhängigkeit der Suppression durch passiv applizierten Antikörper von der Anwesenheit von T Zellen postuliert (99). Fridman et al. (49) beschrieben 1974 einen Faktor der von antigenstimulierten Lymphknotenzellen sowie Thymuszellen (50) produziert wurde und die Fähigkeit besaß, Immunglobuline über ihr Fc Fragment zu binden. Dieser immunglobulinbindende Faktor (IBF), der vermutlich einen T Zell Fc Rezeptor darstellt (92), supprimierte die PFC Antwort gegen SRBC (54), woraus die Autoren eine mögliche Beteiligung des T Zell Fc Rezeptors bei der Immunregulation ableiteten.

In Untersuchungen von Lees und Sinclair (76) verhinderte dagegen die Gegenwart eines nicht näher definierten T Zellfaktors eine Immunsuppression durch Antikörper. In Anlehnung an die Resultate von Gisler und Fridman vermuteten Lees und

Sinclair eine Interaktion von diesen T Zellfaktoren mit Fc Fragmenten von Antikörpern, wodurch deren suppressiver Effekt beseitigt worden sei.

In einer weiteren Untersuchung von Rubin et al. (110) über die Bedeutung von Fc Rezeptoren auf T Zellen, werden diese sogar als unwichtig für die Funktion von T Zellen bezeichnet.

Eine Beteiligung von Makrophagen bei der Immunregulation durch Antikörper wurde ebenfalls häufig postuliert, wobei der Suppressionseffekt meist auf eine Elimination von Antigen durch makrophagenabhängige Phagozytose von Antigen-Antikörperkomplexen zurückgeführt wurde (113, 68).

Abrahams (2) sowie Thomson und Jutila (133) beschrieben einen direkten Angriff von spezifischen IgG Antikörpern auf Makrophagen, der eine Beeinträchtigung ihrer Helferfunktion zur Folge hatte, so daß aus diesem Grunde die resultierende PFC Antwort gehemmt war. Ein gegenteiliger Befund - d.h. die Aufhebung eines antikörpervermittelten Immundefektes durch Zugabe von Makrophagen vorimmunisierter Tiere zu Normalzellen in vitro - wurde von Haughton (61) erhoben. Eine Beteiligung von Fc Rezeptoren auf Makrophagen wurde dagegen bei keinem der beschriebenen Phänomene postuliert.

Diese große Anzahl unterschiedlicher Befunde über die Beteiligung von T Zellen und Makrophagen bei der antikörpervermittelten Hemmung machte es notwendig, Experimente zur Charakterisierung der Zielzelle durchzuführen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß eine Entfernung von T Zellen oder Makrophagen aus der Milzzellsuspension keine Verminderung des suppressiven Effektes von Antikörpern zur Folge hatte.

Entsprechend den Untersuchungen von Sjöberg et al. (125) wurde als Ersatz der Helferfunktion in T Zell- bzw. makrophagenverarmten Kulturen LPS eingesetzt. Während anti-theta behandelte- bzw. makrophagenverarmte Zellen alleine kaum reagierten (PFC Werte im background Bereich), bewirkte die Zugabe von LPS

eine normale Reaktivität. Im Falle der makrophagenverarmten Zellen waren nach Zugabe von LPS sogar etwas höhere PFC Werte als bei der Normalkontrolle zu verzeichnen, was man vermutlich auf die zusätzliche Anwesenheit von Mercaptoäthanol im Kulturmedium zurückführen muß, das teilweise als Makrophagenersatz wirkt (23). Entsprechend den Untersuchungen von Armerding u. Katz (6) bewirkte LPS Zugabe zu normalen Zellen eine Stimulation von deren PFC Antwort. Zugabe von Antikörper führte jedoch auch in diesen Kulturen zu einer Reduktion der Plaquewerte, die prozentual vergleichbar war mit Hemmwerten nach Antikörperzugabe in normalen Kulturen ohne LPS Zusatz. Der Vergleich der Plaquewerte von LPS substituierten Normalzellen gegenüber LPS substituierten T zellfreien Kulturen ließ Armerding und Katz folgern, daß LPS kein T Zellersatz sei: Die Antwort der letzteren Gruppe war nämlich sehr viel geringer als die der Normalpopulation mit LPS, obgleich eine Elimination von T Zellen eine relative Vermehrung spezifisch reagibler B Zellen im Kulturansatz bedeutet.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Zugabe von spezifischen Antikörpern zu T zellfreien bzw. makrophagenverarmten Kulturen eine unverminderte Hemmung der PFC Werte zur Folge hatte. Es erscheint daher unwahrscheinlich, daß diese beiden Zellpopulationen bei der antikörpervermittelten Immunsuppression eine wesentliche Rolle spielen. Es wird daraus gefolgert, daß die B Zellen selbst die Zielzellen des regulierenden Antikörpers sind.

Das folgende Schema wurde als Arbeitshypothese für den Mechanismus der antikörpervermittelten Immunregulation erstellt (s. Abb. 12). Die Ausschaltung der spezifischen B Zelle erfolgt durch gleichzeitige Bindung von Antigen-Antikörperkomplexen an Antigenrezeptoren einerseits und Fc Rezeptoren der gleichen Zelle andererseits. Die dadurch bedingte Brückenbildung zwischen beiden Rezeptoren verursacht ein Negativsignal auf die spezifische B Zelle (127).

Dieses Modell, das im Prinzip der von Ryan und Henkart (111) zur Diskussion gestellten Hypothese entspricht, stellt eine Erweiterung des 'tripartite inactivation models' von Chan und Sinclair (22) dar. In diesem Modell wird eine Interaktion von Immunkompetenten Zellen mit Antigen und Antikörper Fc Fragmenten postuliert, die zur Ausschaltung der Immunantwort führt. Der Zelltyp, an den das Fc Stück des Antikörpers bindet, wurde dabei jedoch nicht charakterisiert.

Beide Modelle stehen im Widerspruch zu der 'interlinkage' Hypothese von Diener und Feldmann (33, 44), nach der eine Vernetzung von Antigenrezeptoren auf der B Zelloberfläche durch Antigen-Antikörperkomplexe Ursache für die resultierende Hemmung ist. Für diese Hypothese ist das Vorhandensein eines intakten Fc Stückes auf dem Antikörper völlig unerheblich, und tatsächlich wurde von den beiden Autoren auch kein Unterschied in der Hemmwirkung zwischen intaktem Antikörper und $F(ab)_2$ Fragmenten festgestellt. Diese Daten wurden jedoch alle mit dem T unabhängigen Antigen POL erhoben, dessen hochpolymere Struktur zur Aktivierung der B Zelle selbst führt. In dieser Konstellation ist es denkbar, daß auch ohne Beteiligung von Fc Fragmenten $F(ab)_2$ - Antigenkomplexe die Aktivierung der B Zelle verhindern.

Somit dürfte sich die von Diener und Feldmann beschriebene Hypothese auf die Regulation der Immunantwort gegen T unabhängige Antigene beschränken.

In einer Untersuchung von Hoffmann und Kappler (65) wird den Fc Rezeptoren auf B Zellen eine rein passive Funktion bei der antikörpervermittelten Hemmung zugesprochen.

Da die Zahl Fc rezeptortragender B Zellen die Zahl antigenspezifischer B Zellen weit übertrifft, postulieren diese Autoren eine bevorzugte Anlagerung von Antigen-Antikörper komplexen an Fc rezeptortragende, nicht antigenspezifische B Zellen, wodurch verhindert wird, daß die wenigen spezifischen B Zellen durch Antigen stimuliert werden.

Diese Hypothese erscheint insbesondere deshalb in hohem Maße unwahrscheinlich, weil sie voraussetzt, daß sämtliches Antigen in Antigen-Antikörperkomplexen gebunden ist. Dies kann jedoch nicht der Fall sein, da wie bereits erwähnt (A, 4), schon minimale Mengen Antikörper für eine Suppression ausreichen, die keinesfalls alle antigenen Determinanten neutralisieren könnten.

Weitere Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten das Konzept bestärken, daß eine Ausschaltung der spezifischen B Zelle durch Interaktion von Antigen- und Fc Rezeptoren bewirkt wird. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß diese Interaktion durch einen molekularen Komplex hervorgerufen werden muß, während eine unabhängig voneinander erfolgende Besetzung beider Rezeptoren oder die Besetzung des Fc Rezeptors alleine kein Ausschaltungssignal zur Folge hat.

Dieses Prinzip erscheint auch hinsichtlich der regulatorischen Funktion von Immunkomplexen als äußerst ökonomisch, da die Bindung von Komplexen an Fc Rezeptoren ein völlig unspezifischer Vorgang ist, der jedoch dann zu einer antigenspezifischen Ausschaltung führt, wenn der spezifische Antigenrezeptor in diese Bindung miteinbezogen ist.

Das Prinzip der Vernetzung von Rezeptoren als Voraussetzung zur Ausschaltung einer Immunantwort wurde von Sidman & Unanue (121) auf der Ebene der LPS induzierten, antigenunspezifischen Immunantwort bestätigt. Durch Gabe von anti Immunglobulinserum erhielten diese Autoren eine Hemmung der DNA Synthese nach LPS, die abhängig von einem intakten Fc Stück des anti-Immunglobulinantikörpers war. Gleichzeitig verabreichte lösliche Komplexe (unspezifisch) sowie $F(ab)_2$ Fragmente des anti Immunglobulinserums induzierten keine Hemmung, woraus die Autoren ableiteten, daß Antigenrezeptoren und Fc Rezeptoren im selben molekularen Komplex vernetzt sein müssen, damit ein Negativsignal generiert wird. Diese Untersuchung steht allerdings in Widerspruch zu Befunden von Coutinho und Möller wonach dem Antigenrezeptor keinerlei Bedeutung bei der Aktivierung

oder Hemmung der LPS induzierten Immunantwort zukommt.

Durch die hier vorgelegten Daten wurde somit wahrscheinlich gemacht, daß die Vernetzung von Antigen- und Fc Rezeptoren durch spezifische Antigen-Antikörperkomplexe, die zur Ausschaltung der Immunantwort führt, auf ein und derselben Zelle - der antigenspezifischen B Zelle stattfindet.

Da jedoch vor allem die Elimination von Makrophagen aus einer normalen Milzzellsuspension ein technisches Problem darstellt, so daß eine 100 %ige Entfernung dieser Zellpopulation kaum möglich ist, wurde die Beteiligung von Makrophagen als Zielzellen bei der antikörpervermittelten Hemmung in einem weiteren Versuchsansatz ausgeschlossen.

Für den Fall, daß der Fc Rezeptor auf Makrophagen als Angriffspunkt für das Fc Fragment des spezifischen Antigen-Antikörperkomplexes dient und nach zusätzlicher Bindung des antigenen Anteils des Komplexes an den Antigenrezeptor ein Negativsignal von den Makrophagen ausgelöst wird, sollte eine Zumischung von Fc rezeptortragenden Makrophagen zu Fc negativen Zellkulturen die suppressive Wirkung von Antikörpern in diesen Kulturen zumindest teilweise wieder rekonstituieren. Wie Tab. 16 zeigt, war dies jedoch nicht der Fall. Eine Zumischung von Peritonealzellen als Quelle für Makrophagen bewirkte zwar eine Verbesserung der Reaktivität von Fc negativen Zellkulturen (die Ursache hierfür wurde bereits diskutiert), aber Sensitivität gegenüber der suppressiven Wirkung von Antikörpern konnte dadurch nicht erreicht werden. Eine Zumischung gleicher Mengen an Normalzellen konnte die suppressive Wirkung von Antikörpern dagegen wieder teilweise rekonstituieren (41 % Hemmung). Dies läßt darauf schließen, daß in der zugemischten Normalzellpopulation spezifische plaquebildende Zellen vorhanden sind, die für die Rückkoppelungswirkung von Antikörper empfänglich sind. Somit ist die verbesserte Plaqueantwort Fc negativer Zellen nach Zumischung von Makrophagen Ausdruck eines Helfereffektes, während die Zumischung von Normalzellen vorwiegend die Addition spezifischer reagibler Zellen darstellt.

Analog zu den oben beschriebenen Versuchsansätzen wurde auch der Effekt einer Zumischung von T Zellen untersucht. Auch in diesem Experiment konnte wie nach Zumischung von Makrophagen keine Rekonstitution der suppressiven Wirkung von Antikörper beobachtet werden. Das Experiment kann aber vor allem deshalb noch nicht als schlüssig angesehen werden, weil die zugemischten T Zellen nur eine minimale Fc Rosettenbildung zeigten (3 %), so daß die Abklärung einer Beteiligung von Fc positiven T Zellen an der antikörpervermittelten Immunsuppression noch aussteht.

Nach Untersuchungen von Moretta et al. (89) gibt es im menschlichen peripheren Blut IgG Fc rezeptortragende T suppressor Zellen, die die mitogeninduzierte Aktivierung von B Zellen hemmen, sowie IgM Fc rezeptortragende T Helferzellen. Nach neuesten Untersuchungen (Moretta et al., 4th european immunology meeting, Budapest, April 1978) verläuft die T suppressor abhängige Hemmung wahrscheinlich über Freisetzung eines löslichen Faktors, der T Helferzellen negativ beeinflußt.

Der Nachweis eines analogen Regelsystems bei der Maus könnte eine Verbindung herstellen zwischen der antikörpervermittelten Immunregulation und der Regulation durch T suppressor Zellen, wie sie von Calkins et al. postuliert wurde (19).

Ungeachtet dieser noch offenen Frage, ob eine Verbindung zwischen den Funktionsmechanismen von antikörpervermittelter Immunsuppression und Hemmung durch T suppressor Zellen besteht, zeigen die hier vorgelegten Untersuchungen zum Mechanismus der Immunregulation durch Antikörper, daß eine Ausschaltung der spezifischen B Zelle durch spezifische Antigen-Antikörperkomplexe bewirkt werden kann, die sich gleichzeitig an Antigenrezeptoren und Fc Rezeptoren der spezifischen B Zelle selbst binden. Durch diese Vernetzung der beiden Rezeptortypen wird ein Negativsignal induziert, das eine Hemmung der Antikörperproduktion dieser Zelle zur Folge hat.

Eine andere Möglichkeit für die selektive Hemmung der humoralen Immunantwort wurde durch die in bestimmten Experimentalmodellen nachweisbaren anti-idiotypischen- bzw. anti-Rezeptorantikörper postuliert, die gegen die Antigenerkennungsstruktur eines Immunglobulins bzw. Immunglobulinrezeptors gerichtet sind (Übersicht s. 47). Der Nachweis anti-idiotypischer Antikörper ist jedoch bisher nur in relativ artefiziellen Antigen-Systemen möglich, so daß die Wertigkeit dieses Regulationstyps bisher schwer zu beurteilen ist. Der zugrundeliegende Hemmechanismus ist ebenfalls ungeklärt, jedoch scheint es prinzipiell nicht ausgeschlossen, daß die Hemmung analog den in dieser Arbeit beschriebenen Mechanismen verläuft und letzten Endes eine weitere Untergliederung der antikörpervermittelten Hemmung darstellt.

Ein interessanter Befund dieser Arbeit, der auch durch Untersuchungen von Miyama 1978 (85) bestätigt wurde, liegt in dem Nachweis Fc-rezeptornegativer B-Zellen, die zur Bildung von spezifischen Antikörpern in der Lage sind. Diesen Fc-negativen B-Zellen scheint eine besondere biologische Bedeutung zuzukommen. Bereits Basten 1972 (10) beobachtete, daß der Fc-Rezeptor nur auf reifen B-Zellen, nicht aber auf Vorläuferzellen und Plasmazellen vorhanden ist. Dies spricht dafür, daß dieser Rezeptor ein Marker für ontogenetische bzw. funktionelle Differenzierungsstadien der B-Zelle ist. Befunde von Yodoi 1978 (141) bestätigen diese Vermutung, da sie zeigen konnten, daß bei Kultivierung Fc-rezeptornegativer Zellen 3 - 4 Tage nach Kulturansatz Fc-rezeptortragende Zellen auftreten. Nach Paraskevas (96) ist der Fc-Rezeptor unmittelbar nach Antigenstimulation nicht mehr nachweisbar, sondern erst wieder ca. 1 Woche später, was dem bereits beschriebenen Befund des capping Phänomens (1) entsprechen könnte.

Das in der vorliegenden Arbeit aufgestellte Konzept einer gleichzeitigen Bindung von Immunkomplexen an Antigen- und

Fc Rezeptoren als Voraussetzung der spezifischen Immunsuppression erklärt die Tatsache, daß eine bereits angelaufene Immunantwort durch passiv applizierten Antikörper nicht mehr gehemmt werden kann, da die B Zelle nach Aktivierung wie auch die Plasmazelle offensichtlich keinen Fc Rezeptor besitzen. Andererseits muß es in der physiologischen Regulation der Immunantwort durch endogen produzierten Antikörper die Möglichkeit einer Rückkoppelung auch in der Spätphase einer Immunantwort geben. Die Kinetik der Antikörperproduktion legt eine derartige Regulation nahe, da es offensichtlich ist, daß zeitlich parallel mit dem Ansteigen der IgG Produktion ein Abfall der IgM Produktion erfolgt, der auf einer Suppression durch IgG Antikörper beruhen könnte. Desgleichen ist im zeitlichen Verlauf einer Sekundärantwort der Anteil IgM produzierender Zellen auf ein Plateau von maximal 10 % der Gesamtantwort erniedrigt. Dieser Restanteil nicht geblockter IgM sezernierender Zellen könnte vielleicht eine Zellpopulation repräsentieren, die keine Fc Rezeptoren besitzt und daher nicht sensitiv gegenüber der Rückkoppelungswirkung von IgG Antikörpern ist.

Hinsichtlich der Frage nach der physiologischen Bedeutung des in dieser Arbeit aufgezeigten Funktionsmechanismus der antikörperbedingten Hemmung, besitzen die Fc rezeptornegativen B Zellen eine zentrale Schlüsselposition.

Die zur Erhaltung eines biologischen Gleichgewichtes notwendige gleichzeitige Anwesenheit von aktivierbaren und hemmbaren Funktionssystemen ist für das hier vorgeschlagene Modell zum Regulationsmechanismus der humoralen Immunantwort voll gewährleistet. Die Mehrzahl reagibler B Zellen trägt Fc Rezeptoren und ist somit durch Antikörper hemmbar; die physiologische Schlüsselposition reagibler, aber Fc negativer B Zellen beruht darin, daß sie auch nach Etablierung eines effektiven feedback Potentials (hoher IgG Spiegel) nachgebildet werden und zur Aufrechterhaltung der spezifischen Reaktionsbereitschaft zur Verfügung stehen.

E Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, negative Rückkopplungsmechanismen der humoralen Immunantwort zu charakterisieren und die ihnen zugrundeliegende Wirkungsweise zu definieren. In anfänglichen Experimenten wurden zunächst Befunde einer bereits abgeschlossenen Dissertation (140), in denen sich erste Hinweise auf negative Rückkoppelungsphänomene ergeben hatten, weiterverfolgt. Es konnte gezeigt werden, daß B Zellen nach Transfer in syngene, unbehandelte Empfänger unter geeigneten Bedingungen eine antigenspezifische Suppression der Empfängerimmunantwort bewirken konnten. Voraussetzung für den suppressiven Effekt transferierter B Zellen war eine Hyperimmunisierung der Spendertiere mit dem spezifischen Antigen. Dieser Suppressionseffekt transferierter B Zellen, der sich als unabhängig von der Beteiligung anderer Zellpopulationen wie T Zellen oder Makrophagen erwies, war für eine Zeitspanne von 21 Wochen im Empfänger bzw. im Spendermilzzellmaterial nachweisbar. Es konnte im folgenden gezeigt werden, daß diese langanhaltende, antigenspezifische Hemmung auf einer Freisetzung spezifischer IgG Antikörper aus den Übertragenen Spenderzellen beruht. Mit Beendigung der Antikörperproduktion, die parallel einhergeht mit einer Differenzierung ehemals produzierender B Zellen zu Gedächtniszellen, endete auch die Hemmung. Sie konnte jedoch durch Reaktivierung ruhender Gedächtniszellen zur Antikörperproduktion (mittels LPS) von neuem induziert werden.

Die Daten dieses Untersuchungsabschnittes ergaben somit, daß B Zellen durch ihre eigenen Produkte in ihrer Reaktivität reguliert werden können und zwar (im Unterschied zu den bereits bekannten Untersuchungen zur Hemmung durch passiv applizierten Antikörper) auch durch Antikörper, die nach Übertragung von B Zellen im Empfänger produziert wurden. Somit kann der durch T suppressor Zellen bewirkten spezifischen

Immunregulation ein durch B Zellen vermitteltes Regulations-system gegenübergestellt werden.

In den darauffolgenden Untersuchungen in vivo und in vitro wurde unter Verwendung gereinigter IgG Antiseren der Mechanismus näher definiert, der der antikörpervermittelten Immunsuppression zugrundeliegt.

Der Suppressionseffekt passiv applizierten bzw. Zellkulturen zugesetzten Antiserums erwies sich als unabhängig von der Herkunft des Antiserums - d.h. homologes und heterologes Antiserum besaßen die gleiche Hemmpotenz. In Übereinstimmung mit einem Teil der vorliegenden Literatur erwies sich der Hemmeffekt als abhängig von einem intakten Fc Fragment auf dem Antikörpermolekül, da $F(ab)_2$ Fragmente des spezifischen Antikörpers keine Hemmwirkung besaßen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß durch künstliche Substitution von Fc Anteilen an $F(ab)_2$ Fragmente (durch Zugabe gegen $F(ab)_2$ gerichteter Antikörper) eine Suppression der Immunantwort erreicht werden konnte, die der von intakten Antikörpern entsprach.

Das Fc Fragment des Antikörpers war jedoch nicht alleine in der Lage, den Hemmeffekt zu induzieren, sondern benötigte dazu die Interaktion mit einem Akzeptormolekül auf der Zelloberfläche. Als solches konnte der Fc Rezeptor ermittelt werden.

Während in Fc rezeptortragenden Zellpopulationen der Antikörper seine suppressive Wirkung entfalten konnte, besaß er keine Hemmwirkung in Fc rezeptorfreen Zellpopulationen.

Obwohl der Fc Rezeptor nicht nur auf B Zellen, sondern auch auf einigen T Zellsubpopulationen und Makrophagen vorkommt, weisen die erhaltenen Versuchsdaten darauf hin, daß die Fc Rezeptoren auf B Zellen die hauptsächlichen Akzeptoren der Fc Anteile von Antikörpern sind.

Da der Fc Rezeptor unspezifisch Fc Fragmente beliebiger IgG Antikörpermoleküle bindet - der beobachtete Hemmeffekt von anti-SRBC Antikörpern jedoch streng spezifisch ist - wurde

F Literaturverzeichnis:

1. Abbas, A.K., E.R. Unanue (1975)
Interrelationships of surface immunoglobulin and Fc
receptors on mouse B lymphocytes.
J. Immunol. 115, 1665
2. Abrahams, S., A. Phillips, R.G. Miller (1973)
Inhibition of the immune response by 7S antibody.
J. Exp. Med. 137, 870
3. Andersson, J., O. Sjöberg, G. Möller (1972)
Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in
vitro by lipopolysaccharides.
Eur. J. Immunol. 2, 349
4. Andersson, J., A. Coutinho, F. Melchers (1977)
Frequencies of mitogen-reactive B cells in the mouse
I. Distribution in different lymphoid organs from different
inbred strains of mice at different ages.
J. Exp. Med. 145, 1511
5. Anderson, C.L., H.M. Grey (1974)
Receptors for aggregated IgG on mouse lymphocytes.
Their presence on thymocytes, thymus-derived and bone-
marrow derived lymphocytes.
J. Exp. Med. 139, 1175
6. Armerding, D., D.H. Katz (1974)
Activation of T and B lymphocytes in vitro. Regulatory
influence of LPS on specific T-cell helper function.
J. Exp. Med. 139, 24
7. Askonas, B.A., J.M. Rhodes (1965)
Immunogenicity of antigen-containing RNA preparations
from macrophages.
Nature 205, 470

8. Bach, F.H., B.J. Alter, S. Solliday et al. (1970)
Lymphocyte reactivity in vitro. II. Soluble reconstituting factor permitting response of purified lymphocytes.
Cell. Immunol. 1, 219
9. Baker, P.J., N.D. Reed, P.W. Stashak et al. (1973)
Regulation of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. I. Nature of regulatory cells.
J. Exp. Med. 137, 1431
10. Basten, A., N.L. Warner, T. Mandel (1972)
A receptor for antibody on B lymphocytes.
J. Exp. Med. 135, 627
11. Basten, A., J.F.A.P. Miller, J. Sprent, J. Pye (1972)
A receptor for antibody on B lymphocytes.
J. Exp. Med. 135, 610
12. Benjamin, D.C. (1975)
Evidence for specific suppression in the maintenance of immunologic tolerance.
J. Exp. Med. 141, 635
13. Berman, M., W.O. Weigle (1977)
B lymphocyte activation by the Fc region of IgG.
J. Exp. Med. 146, 241
14. Bloom, B.R., B. Bennett (1966)
Mechanisms of a reaction in vitro associated with delayed hypersensitivity.
Science 153, 80
15. Boyse, E.A., M. Miyazawa, T. Aoki, L.J. Old (1968)
Ly-A and Ly-B: Two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse.
Proc. Roy. Soc. B. 178, 175
16. Bretscher, P.A., M. Cohn (1970)
A theory of self non-self discrimination.
Science 169, 1042

17. Britton, S., T. Wepsic, G. Möller (1968)
Immunogenicity of two complex antigens retained in vivo.
Immunology 14, 491
18. Burnet, F.M. (1959)
The clonal selection theory of acquired immunity.
Cambridge University Press, London
19. Calkins, C., S. Orbach-Arbouys, O. Stutman, R.K. Gershon
(1976) Cell interactions in the suppression of in vitro
antibody responses.
J. Exp. Med. 143, 1421
20. Cantor, H., F.W. Shen, E.A. Boyse (1976)
Separation of helper T cells from suppressor T cells
expressing different Ly components.
J. Exp. Med. 143, 1391
21. Cerottini, J.C., A.A. Nordin, K.T. Brunner (1974)
Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and
tumor immunology.
Adv. Immunol. 18, 67
22. Chan, P.L., N.R. Stc. Sinclair (1971)
Regulation of the immune response. V. An analysis of the
function of the Fc portion of antibody in suppression of
an immune response with respect to interaction with
components of the lymphoid system.
Immunology 21, 967
23. Chen, C.H., J.G. Hirsch (1972)
The effect of mercaptoethanol and of peritoneal macrophages
on the antibody forming capacity of nonadherent mouse
spleen cells in vitro.
J. Exp. Med. 136, 604
24. Claman, H.N., E.A. Chaperon, R.F. Triplett (1966)
Immunocompetence of transferred thymus-marrow cell
combinations.
J. Immunol. 97, 928

25. Cooper, M.D., A.R. Lawton (1972)
The mammalian 'bursa equivalent'. Does lymphoid differentiation along plasma cell lines begin in the gut associated lymphoepithelial tissues (GALT) of mammals?
In: Contemporary Topics in Immunobiology
M.G. Hanna, Plenum Press, New York, 49-68
26. Coutinho, A., G. Möller (1974)
Immune activation of B cells: evidence for one nonspecific triggering signal not delivered by the Ig receptors.
Scand. J. Immunol. 3, 133
27. Cunningham, A.J., A. Szenberg, (1968)
Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells.
Immunology 14, 599
28. Davies, A.J.S., E. Leuchars, V. Wallis, et al. (1967)
The failure of thymus derived cells to make antibody.
Transplantation 5, 222
29. Diamantstein, T., W. Keppler, E. Blitstein-Willinger (1976)
Suppression of the primary immune response in vivo to sheep red blood cells by B cell mitogens.
Immunology 30, 401
30. Dickler, H., D.H. Sachs (1974)
Evidence for the identity or close association of the Fc receptor of B lymphocytes and alloantigens determined by the Ir region of the H-2 complex.
J. Exp. Med. 140, 779
31. Dickler, H., J.L. Cone, M.T. Kubicek, D.H. Sachs (1975)
Detection of non-H-2 antigen(s), which, like Ia antigens, are associated with the Fc receptor of B lymphocytes.
J. Exp. Med. 142, 796
32. Dickler, H.B. (1976)
Lymphocyte receptors for immunoglobulin.
Adv. Immunol. 24, 167

33. Diener, E., M. Feldmann (1970)
Antibody mediated suppression of the immune response
in vitro. II. A new approach to the phenomenon of immunological tolerance.
J. Exp. Med. 132, 31
34. Doherty, P.C., R.M. Zinkernagel (1974)
T cell mediated immunopathology in viral infection.
Transpl. Rev. 19, 89
35. Dukor, P., K.U. Hartmann (1973)
Hypothesis. Bound C3 as the second signal for B cell activation.
Cell. Immunol. 7, 349
36. Dumonde, D.C., R.A. Wolstencroft, G.S. Panay et al. (1969)
'Lymphokines': non antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation.
Nature 224, 38
37. Ehrlich, P. (1900)
Croonian lecture: on immunity with special reference to cell life.
Proc. Roy. Soc. 66, 424
38. Erb, P., M. Feldmann (1975)
The role of macrophages in the generation of T helper cells. I. The requirement for macrophages in helper cell induction and characteristics of the macrophage - T cell interaction.
Cell. Immunol. 19, 356
39. Falk, R.E., L. Collste, G. Möller (1970)
In vitro detection of transplantation immunity: the inhibition of migration of immune spleen cells and peripheral blood lymphocytes.
J. Immunol. 104, 1287

40. Feldmann, M., J. J.V. Nossal (1972)
T cells, B cells and macrophages.
Transpl. Rev. 13, 3
41. Feldmann, M., A. Basten (1972)
Cell interactions in the immune response in vitro.
III. Specific collaboration across a cell impermeable
membrane.
J. Exp. Med. 136, 49
42. Feldmann, M., E. Diener (1970)
Antibody mediated suppression of the immune response
in vitro. I. Evidence for a central effect.
J. Exp. Med. 131, 247
43. Feldmann, M. (1974)
T cell suppression in vitro. I. Role in regulation
of antibody responses.
Eur. J. Immunol. 4, 660
44. Feldmann, M., E. Diener (1971)
Antibody mediated suppression of the immune response
in vitro. III. Low zone tolerance in vitro.
Immunology 21, 387
45. Feldmann, M., E. Diener (1972)
Antibody mediated suppression of the immune response in
vitro. IV. The effect of antibody fragments.
J. Immunol. 108, 93
46. Fishman, M., F.L. Adler (1963)
Antibody formation initiated in vitro. II. Antibody syn-
thesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers
containing nucleic acid derived from macrophages incubated
with antigen.
J. Exp. Med. 117, 595
47. Fitch, F.W. (1975)
Selective suppression of immune responses.
Progress in Allergy, Vol. 19, 195

48. Freda, J.V., J.G. Gorman, W. Pollack (1966)
Rh factor: prevention of isoimmunization and clinical trials in mothers.
Science 151, 828
49. Fridman, W.H., R.A. Nelson, A. Liabeuf (1974)
Production of an immunoglobulin-binding factor (IBF) by antigen-stimulated lymph node lymphocytes.
J. Immunol. 113, 1008
50. Fridman, W.H., P. Golstein (1974)
Immunoglobulin-binding factor present on and produced by thymus-processed lymphocytes (T cells).
Cell. Immunol. 11, 442
51. Gershon, R.K., K. Kondo (1970)
Cell interactions in the induction of tolerance.
Immunology 18, 723
52. Gershon, R.K. (1975)
A disquisition on suppressor T cells.
Transpl. Rev. 26, 170
53. Gershon, R.K., P. Cohen, R. Hencin, S.A. Liebhaber (1970)
Suppressor T cells.
J. Immunol. 108, 586
54. Gisler, R.H., W.H. Fridman (1975)
Suppression of in vitro antibody synthesis by immunoglobulin-binding factor.
J. Exp. Med. 142, 507
55. Golub, E.S. (1971)
Brain associated B antigen: reactivity of rabbit anti mouse brain with mouse lymphoid cells.
Cell. Immunol. 2, 353
56. Gorczynski, R.M., G. Miller, R.A. Phillips (1971)
In vivo requirement for a radiation resistant cell in the immune response to sheep erythrocytes.
J. Exp. Med. 134, 1201

57. Greaves, M.F., G. Janosy (1972)
Elicitation of selective T and B lymphocyte responses
by cell surface binding ligands.
Transpl. Rev. 11, 87
58. Hanna, G., P. Nettesheim, M. Francis (1969)
Requirement for continuous antigenic stimulation in the
development and differentiation of antibody forming cells.
J. Exp. Med. 129, 953
59. Harwell, L., P. Marrack, J.W. Kappler (1977)
Suppressor T cell inactivation of a helper T cell factor.
Nature 265, 57
60. Harwell, L., J.W. Kappler, P. Marrack (1976)
Antigen specific and nonspecific mediators of T cell/
B cell cooperation.
J. Immunol. 116, 1379
61. Haughton, G. (1974)
Specific immunosuppression by passive antibody.
Participation of macrophages in reversal of suppression
by peritoneal exudate cells from immune animals.
Cell. Immunol. 13, 230
62. Hege, J.S., L.J. Cole (1966)
Antibody plaque forming cells: kinetics of primary and
secondary responses.
J. Immunol. 96, 559
63. Henry, C., N.K. Jerne (1968)
Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regu-
lation of the primary immune response.
J. Exp. Med. 128, 1
64. Hjelm, H., K. Hjelm (1972)
Protein A from staphylococcus aureus. Its isolation by
affinity chromatography and its use as an immunosorbent
for isolation of immunoglobulins.
FEBS Lett. 28, 73

65. Hoffmann, M.K., J.W. Kappler, J.A. Hirst, H.F. Oettgen (1974)
Regulation of the immune response. Antibody mediated inhibition of T and B cell cooperation in the in vitro response to red cell antigens.
Eur. J. Immunol. 4, 285
66. Jerne, N.K., A.A. Nordin (1963)
Plaque formation in agar by single antibody producing cells.
Science 140, 405
67. Julius, M.H., E. Simpson, L.A. Herzenberg (1973)
A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3, 645
68. Kappler, J.W., M. Hoffmann, R.W. Dutton (1971)
Regulation of the immune response. I. Differential effect of passively administered antibody on the thymus-derived and bone-marrow derived lymphocytes.
J. Exp. Med. 134, 577
69. Katz, D.H., B. Benacerraf (1972)
The regulatory influence of activated T lymphocytes on B cell responses to antigen.
Adv. Immunol. 15, 1
70. Katz, D.H., B. Benacerraf (1975)
Hypothesis. The function and interrelationship of T cell receptors, Ir genes and other histocompatibility gene products.
Transpl. Rev. 22, 175
71. Kearney, J.F., A.R. Lawton (1975)
B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes.
J. Immunol. 115, 671

72. Kincade, P.W., A.R. Lawton, D.E. Bockman, M.D. Cooper (1970)
Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of
antibody mediated suppression of immunoglobulin M syn-
thesis in chickens.
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1918
73. Lawton, A.R., R.A. Asofsky, M.B. Hylton, M.D. Cooper (1972)
Suppression of immunoglobulin class synthesis in mice.
I. Effects of treatment with antibody to μ -chain.
J. Exp. Med. 135, 277
74. Lederberg, J. (1959)
Genes and antibodies.
Science 129, 1649
75. Lees, R.K., N.R.Stc. Sinclair (1973)
Regulation of the immune response. VII. In vitro
immunosuppression by $F(ab)_2$ or intact IgG antibodies.
Immunology 24, 735
76. Lees, R.K., N.R.Stc. Sinclair (1975)
Regulation of the immune response. IX. Resistance to
antibody mediated immunosuppression induced by the pre-
sence of the allogeneic effect.
Cell. Immunol. 17, 525
77. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265
78. Mantovani, B., M. Rabinovitch, V. Nussenzweig (1972)
Phagocytosis of immune complexes by macrophages.
Different roles of the macrophage receptor sites for
complement (C3) and for immunoglobulin (IgG).
J. Exp. Med. 135, 780
79. Marbrook, J. (1967)
Primary immune response in cultures of spleen cells.
Lancet 2, 1279

80. Melchers, F., A. Coutinho, G. Heinrich, J. Andersson (1975)
Continuous growth of mitogenreactive B lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 4, 853
81. Miller, J.F.A. (1962)
Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse.
Proc. Roy. Soc. B. 156, 415
82. Mishell, R.J., R.W. Dutton (1967)
Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice.
J. Exp. Med. 126, 423
83. Mitchison, N.A., K. Rajewsky, R.B. Taylor (1970)
Cooperation of antigenic determinants and of cells in the induction of antibodies.
In: Developmental Aspects of antibody formation and structure. Ed.: J. Sterzl, H. Riha, Academic Press, New York
84. Mitchison, N.A. (1967)
Antigen recognition responsible for the induction in vitro of the secondary response.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 431
85. Miyama, M., K. Kuribayashi, J. Yodoi, et al. (1978)
Immunological properties of Fc receptor on lymphocytes. I. Functional differences between Fc receptor positive and negative lymphocytes in humoral immune responses.
Cell. Immunol. 35, 253
86. Möller, G. (1968)
Regulation of cellular antibody synthesis. Cellular 7S production and longevity of 7S antigensensitive cells in the absence of antibody feedback.
J. Exp. Med. 127, 291
87. Möller, G. (1969)
Regulation of cellular antibody synthesis. Selective suppression by antibody of the immune response induced by a high antigen dose.
Immunology 17, 227

88. Möller, G., A. Coutinho (1975)
Role of C3 and Fc receptors in B lymphocyte activation.
J. Exp. Med. 141, 647
89. Moretta, L., S.R. Webb, C.E. Grossi, et al. (1977)
Functional analysis of two human T cell subpopulations:
Help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG.
J. Exp. Med. 146, 184
90. Morris, A., G. Müller (1968)
Regulation of cellular antibody synthesis. Effect of adoptively transferred antibody-producing spleen cells on cellular antibody synthesis.
J. Immunol. 101, 439
91. Mosier, D.E., L.W. Coppelson (1968)
A three-cell interaction required for the induction of the primary immune response in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 61, 542
92. Neauport-Sautes, C., D. Dupuis, W.H. Fridman (1975)
Specificity of Fc receptors of activated T cells.
Relation with immunoglobulin-binding factor.
Eur. J. Immunol. 5, 849
93. Nisonoff, A., F.C. Wissler, L.N. Lipman, D.L. Woernly (1969)
Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds.
Arch. Biochem. and Biophysics 89, 230
94. Nussenzweig, V., C. Bianco, P. Dukor, A. Eden (1971)
Receptors for C3 on B lymphocytes: possible role in the immune response.
Progress in Immunology, Ed.: B. Amos, Academic Press New York, 73
95. Owen, J.J.T., M.D. Cooper, M.C. Raff (1974)
In vitro generation of B lymphocytes in mouse fetal liver-a mammalian 'bursa equivalent'.
Nature 249, 361

96. Paraskevas, F., K.B. Orr, E.D. Anderson et al. (1972)
The biological significance of Fc receptor on mouse B lymphocytes.
J. Immunol. 108, 1729
97. Persson, U. (1977)
Lipopolysaccharide - induced suppression of the primary immune response to a thymus dependent antigen.
J. Immunol. 118, 789
98. Pierce, C.W. (1969)
Immune responses in vitro. II. Suppression of the immune response in vitro by specific antibody.
J. Exp. Med. 130, 365
99. Playfair, J.H. (1974)
The role of antibody in T-cell responses.
Clin. Exp. Immunol. 17, 1
100. Raff, M.C. (1971)
Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice.
Transpl. Rev. 6, 52
101. Raff, M.C. (1970)
Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence.
Immunology 19, 637
102. Rajewsky, K., V. Schirmacher, S. Nase, N.K. Jerne (1969)
The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity.
J. Exp. Med. 129, 1131
103. Ramasamy, R., N.E. Richardson, A. Feinstein (1975)
The specificity of the Fc receptor on murine lymphocytes for immunoglobulins of the IgG and IgM classes.
Immunology 30, 851
104. Ramasamy, R., D.S. Secher, K. Adetugbo (1975)
C_H3 domain of IgG as binding site to Fc receptor on mouse lymphocytes.
Nature 253, 656

105. Ramasamy, R., A. Munro, C. Milstein (1974)
Possible role for the Fc receptor on B lymphocytes.
Nature 249, 573
106. Reif, A.E., J.M.V. Allen (1963)
Specificity of isoantisera against leukemia and thymus
lymphocytes.
Nature 200, 1332
107. Rowley, D. (1962)
Phagocytosis.
Adv. Immunol. 2, 241
108. Rowley, D.A., F.W. Fitch, M.A. Axelrad, C.W. Pierce (1969)
The immune response suppressed by specific antibody.
Immunology 16, 549
109. Rowley, D.A., F.W. Fitch (1964)
Homeostasis of antibody formation in the adult rat.
J. Exp. Med. 120, 987
110. Rubin, B., B. Hertel-Wulff (1975)
Biological significance of Fc receptor bearing cells
among activated T lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 4, 451
111. Ryan, J.L., P.A. Henkart (1976)
Inhibition of B lymphocyte activation by interaction
with Fc receptors.
Immunological Comm. 5, 455
112. Ryan, J.L., P.A. Henkart (1976)
Fc receptor-mediated inhibition of murine B lymphocyte
activation.
J. Exp. Med. 144, 768
113. Ryder, R.J.W., R.S. Schwartz (1969)
Immunosuppression by antibody: localization of site of action.
J. Immunol. 103, 970

114. Schimpl, A., E. Wecker (1972)
Replacement of T cell function by a T cell product.
Nature New Biol. 237, 15
115. Schimpl, A., T. Hünig, E. Wecker (1974)
Separate induction of proliferation and maturation of B cells.
In: Progress in Immunology II., Ed.: L. Brent, J. Holborow
North Holland Publishing Co., Amsterdam, p. 135
116. Schultze, H.E., H. Gross (1929)
Fraktionierung und Konzentrierung hämolytischer Immunsere.
Biochem. Z. 215, 115
117. Scribner, D.J., D. Fahrney (1976)
Neutrophil receptors for IgG and complement: Their roles
in the attachment and ingestion phases of phagocytosis.
J. Immunol. 116, 892
118. Sercarz, E.E., A.H. Coons (1962)
The exhaustion of specific antibody-producing capacity
during a secondary response.
In: Mechanisms of Immunological Tolerance,
Ed.: M. Hasek, A. Lenogerova, M. Vojtiskova
Academia, Prague, 73
119. Sever, J.L. (1962)
Application of a microtechnique to viral serological in-
vestigations.
J. Immunol. 88, 320
120. Shand, F.L., J. Ivanyi (1977)
Inhibition of B cell function by Con A-induced suppressor
cells.
Scand. J. Immunol. 6, 1329

121. Sidman, C.L., E.R. Unanue (1976)
Control of B lymphocyte function. I. Inactivation of mitogenesis by interactions with surface immunoglobulin and Fc receptor molecules.
J. Exp. Med. 144, 882
122. Simonsen, M. (1962)
Graft-versus-host reactions. Their natural history and applicability as tools of research.
Progr. Allergy 6, 349
123. Sinclair, N.R. Stc. (1969)
Regulation of the immune response. I. Reduction in ability of specific antibody to inhibit longlasting IgG immunological priming after removal of the Fc fragment.
J. Exp. Med. 129, 1183
124. Sinclair, N.R. Stc., R.K. Lees, P.L. Chan, R.H. Khan (1970)
Regulation of the immune response. II. Further studies on differences in ability of F(ab)₂ and 7S antibodies to inhibit an antibody response.
Immunology 19, 105
125. Sjöberg, O., J. Andersson, G. Möller (1972)
Lipopolysaccharides can substitute for helper cells in the antibody response in vitro.
Eur. J. Immunol. 2, 326
126. Spiegelberg, H.L., W.O. Weigle (1965)
The catabolism of homologous and heterologous 7S gamma globulin fragments.
J. Exp. Med. 121, 323
127. Stockinger, B., E.-M. Lemmel (1978)
Fc receptor dependency of antibody mediated feedback regulation: on the mechanism of inhibition.
Cell. Immunol. in Druck
128. Stockinger, B., U. Botzenhardt, E.-M. Lemmel (1978)
On the feedback regulation of humoral immune response.
I. Evidence for 'B suppressor cells'.
Immunology, in Druck

129. Stout, R.D., L.A. Herzenberg (1975)
The Fc receptor on thymus derived lymphocytes. Detection of a subpopulation of murine T lymphocytes bearing the Fc receptor.
J. Exp. Med. 142, 611
130. Tada, T., M. Taniguchi, T. Takemori (1975)
Properties of primed suppressor T cells and their products.
Transpl. Rev. 26, 107
131. Tada, T., T. Takemori (1974)
Selective roles of thymus-derived lymphocytes in the antibody response. Differential suppressive effect of carrier-primed T cells on hapten-specific IgM and IgG antibody responses.
J. Exp. Med. 140, 239
132. Thiele, H.G., R. Stark, D. Keeses (1972)
Antigenic correlations between brain and thymus. I. Common structures in rat and mouse brain tissue and thymocytes.
Eur. J. Immunol. 2, 424
133. Thomson, Ph.D., J.W. Jutila (1972)
A mechanism for the unresponsive state in Balb/c mice after repeated doses of sheep erythrocytes.
J. Immunol. 109, 742
134. Uhr, J.W., J.B. Baumann (1961)
The suppression of antibody formation by passively administered antibody.
J. Exp. Med. 113, 935
135. Uhr, J.W., G. Möller (1968)
Regulatory effect of antibody on the immune response.
Adv. Immunol. 8, 81
136. Unanue, E.R. (1972)
The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation.
Adv. Immunol. 15, 45

137. Waksman, B.H., S. Arbouys, B.G. Arnason (1961)
The use of specific 'lymphocyte' antisera to inhibit hypersensitive reactions of the 'delayed' type.
J. Exp. Med. 114, 997
138. Warner, N.L., A. Szenberg, F.M. Burnet (1962)
The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40, 373
139. Wason, W.M., F.W. Fitch (1973)
Suppression of the antibody response to SRBC with $F(ab)_2$ and IgG in vitro.
J. Immunol. 110, 1427
140. Witzelhausen, W. (1975)
Die Hemmung der Primärantwort gegen Schafererythrozyten bei der Maus durch Übertragung spezifisch vorimmunisierter Zellen.
Inauguraldissertation, Mainz 1975
141. Yodoi, J., M. Miyama, T. Masuda (1978)
Immunological properties of Fc receptor on lymphocytes. II. Differentiation from FcR^- to FcR^+ cells and their functional differences in in vitro antibody response.
Cell. Immunol. 35, 266
142. Yoshida, T.O., B. Andersson (1972)
Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 1, 401

Ich danke Herrn Prof. Lemmel (Medizinische Mikrobiologie) und Herrn Prof. Bernhard (Anthropologie) für die Vergabe dieser Arbeit.

Herrn Prof. Lemmel danke ich insbesondere für die intensive Betreuung, sowie - zusammen mit allen übrigen Labormitgliedern - für ein harmonisches Arbeitsklima, daß maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Erb und Frau B. Müller (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Basel) bin ich zu Dank verpflichtet für ihre hilfreiche Einführung in die Techniken der Zellkultivierung sowie für die Überlassung der Methoden für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Kultursysteme.

Den Behringwerken (Marburg) danke ich für die Präparation der in dieser Arbeit getesteten Fc Fragmente.

Lebenslauf

Am 9.6.1952 wurde ich als erstes Kind des Universitätsprofessors Dr.K.H.Bäßler und seiner Ehefrau Dr.H.Bäßler geb.Ranke in Mainz geboren. Im Herbst 1958 wurde ich in Pöcking am Starnberger See eingeschult. Im Frühjahr 1959 wechselte ich in die Volksschule nach Mainz-Zahlbach. Ab 1960 besuchte ich die Volksschule in Mainz-Gonsenheim. 1961 trat ich in das Rabanus Maurus Gymnasium in Mainz ein, an dem ich im Juni 1970 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1970/71 studierte ich in Mainz an der Kunst-hochschule. Im Sommersemester 1971 belegte ich in München das Fach Anthropologie. Ab dem Wintersemester 1972/73 war ich in Mainz für das Fach Biologie eingeschrieben, in dem ich im Februar 1976 die Diplomhauptprüfung ablegte. Im März 1976 begann ich die Promotion im Institut für Medizinische Mikrobiologie. Seit 1974 bin ich mit dem Diplombiologen Hubertus Stockinger verheiratet.

